

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELO ZENI

ESTUDO ESTEREOLÓGICO DAS FIBRAS COLÁGENAS NO ENVELHECIMENTO
DA BEXIGA URINÁRIA EM RATOS.

CURITIBA

2015

MARCELO ZENI

ESTUDO ESTEREOLÓGICO DAS FIBRAS COLÁGENAS NO ENVELHECIMENTO
DA BEXIGA URINÁRIA EM RATOS.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga

CURITIBA

2015

Z54 Zeni, Marcelo.
Estudo estereológico das fibras colágenas no envelhecimento da
bexiga urinária em ratos / Marcelo Zeni. – Curitiba, 2015.
58 f.: il.; color.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga.
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica
Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do
Paraná.

1. Envelhecimento. 2. Envelhecimento celular. 3. Ratos Wistar –
anatomia & histologia. 4. Bexiga urinária – crescimento &
desenvolvimento. 5. Colágeno – biossíntese. 6. Colágeno Tipo I –
biossíntese. 7. Colágeno Tipo III – biossíntese. I. Título. II. Fraga,
Rogério de.

NLMC: WJ 500



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 416ª dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **Marcelo Zeni** com o título **ESTUDO ESTEREOLÓGICO DAS FIBRAS COLÁGENAS NO ENVELHECIMENTO DA BEXIGA URINÁRIA EM RATOS** **Linha de Pesquisa** MÉTODOS DE DETECÇÃO PRECOCE E AVALIAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS EM AFEÇÕES CIRÚRGICAS **Área de Concentração** Clínica Cirúrgica tendo como orientador Professor Doutor Rogério de Fraga.

Às dez horas do dia oito de maio de dois mil e quinze, no auditório da CAD - sala 701 - 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos seguintes professores doutores Luiz Sergio Santos, Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas e Renato Tambara Filho sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata por mim Regina Aparecida Sass Marques secretária desta Pós-Graduação, que será assinada pelos seguintes membros da Banca Examinadora de Avaliação.


Luiz Sergio Santos


Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas


Renato Tambara Filho

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao colega, amigo e orientador, Prof. Dr. Rogério de Fraga, guia e incentivador, mestre e psicólogo, pela paciência, lucidez, compreensão e disponibilidade constantes. Mais do que professor, ofereceu acolhimento e amizade.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, coordenador do Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, pela oportunidade em acreditar no projeto e conceder a possibilidade de executá-lo.

Ao Dr. João Carlos Domingues Repcka, pelo incentivo e cessão do espaço no biotério, possibilitando a realização deste trabalho.

À minha esposa, Amanda, pelos anos de carinho e amor, desde os tempos da Faculdade de Medicina. Parceira incondicional. “A quem torna completo meu tempo perdido”.

Aos meus pais, Lauro e Lenira, ao meu irmão e melhor amigo Juliano, que nos trouxe ao mundo o querido sobrinho Felipe, por serem meus alicerces, bases fortes, amor sempre presente, exemplo positivo e apoio eterno.

Aos colegas de residência médica e amigos para a vida, além de parceiros nessa jornada, Eduardo Felipe Melchiorretto, nas intensas discussões para chegarmos aos resultados, e Bruno Duarte Neves, “sócio”.

À Professora Dra. Djanira Veronez, e ao funcionário Rodrigo Schuh, pelo auxílio na leitura e elaboração dos resultados.

Ao colega e amigo Gustavo Lenci Marques, por abrir os caminhos e por repassar dicas valiosas, além da participação na parte experimental.

Ao grande e velho amigo Ricardo Cella Tormem, pelo auxílio nas traduções.

Aos funcionários, equipe de enfermagem, professores e colegas da Disciplina de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela excelente formação técnica e humana durante estes anos, repassadas durante o período em que tive oportunidade de residir em Curitiba, mas que continuam me inspirando.

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Introdução: Envelhecimento é um processo que culmina na redução funcional de quase todos os órgãos e sistemas. A bexiga urinária tem por função armazenar e eliminar urina ciclicamente. No envelhecimento, a bexiga apresenta decréscimo na capacidade em perfazer seu ciclo normal de enchimento, armazenamento e esvaziamento, manifestando-se como complacência reduzida, aumento do resíduo vesical pós-miccional, além de hiperatividade detrusora e contratilidade prejudicada. Embora identifiquemos os processos fisiológicos envolvidos no envelhecimento da bexiga urinária, os mecanismos pelos quais estes eventos ocorrem permanecem incertos. **Objetivos:** avaliar quantitativamente as mudanças nos colágenos tipos I e III no envelhecimento da bexiga urinária. **Métodos:** 72 ratos Wistar machos foram divididos em 6 grupos de 12 animais cada, e sacrificados em uma idade determinada: 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses. Após a eutanásia, a bexiga urinária foi retirada e realizado estudo estereológico através da técnica Picosirius com análise microscópica sob luz polarizada, para análise da densidade volumétrica (frequência relativa) das fibras colágenas tipos I e III. **Resultados:** A maior densidade volumétrica de colágeno tipo I ocorreu no grupo de 12 meses (19,81%), e a menor no grupo de 6 meses (8,08%, $p < 0,05$). Para o colágeno tipo III, houve um aumento subsequente da frequência relativa dos grupos de 3, 6 e 9 (média máxima aos 9 meses, com 3,62% da composição estrutural da bexiga), com discreta aos 12 meses, seguida de queda brusca da densidade volumétrica nos grupos de ratos mais idosos (18 e 24 meses). Na comparação entre os grupos de ratos mais jovens (de 3 a 12 meses) com os grupos de ratos senis (18 e 24 meses), notamos uma redução significativa da densidade volumétrica do colágeno tipo III ($p < 0,05$). **Conclusões:** Ocorrem alterações significativas na deposição do colágeno tipo I, e, notadamente, no colágeno tipo III, na bexiga urinária de ratos com o processo natural de envelhecimento. Ocorreu um decréscimo significativo na densidade volumétrica de colágeno tipo III quando comparamos ratos senis *versus* jovens, e o momento em que estas alterações ocorrem de maneira mais significativa é a partir dos 12 meses de vida do animal.

Palavras-chave: envelhecimento; bexiga urinária; colágeno.

ABSTRACT

Introduction: Aging is a process that leads to diminished function in almost every physiologic system. The main functions of urinary bladder are to fill, store and eliminate urine cyclically. The aged bladder has declined capacity on doing its normal cycle, manifesting as reduced compliance, increased post-void residual volume, detrusor hyperactivity and impaired contractility. Even that we recognize the physiologic events in bladder aging, the mechanisms how this events occur remain uncertain. **Objectives.** Quantitative assess in changes of collagen types I and III in the natural aging process of the urinary bladder. **Methods.** 72 male Wistar rats were divided in 6 groups of 12 animals each group, and sacrificed in determined ages: 3, 6, 9 12, 18 and 24 months. After euthanasia, the urinary bladder was fully removed and then realized the stereological study using the Picrosirius technique with microscopic analysis under polarized light, to quantify the volumetric density (relative frequency) of the collagen types I and III. **Results.** The maximum volumetric density for collagen type I was observed in the 12-months group (19,81%), and the minimum occurred in the 6-months group (8,08%, $p<0,05$). For the collagen type III, we observed a subsequent increase in volumetric density in 3, 6 and 9-month groups (maximum at 9-months group – 3,62% of bladder wall composition being collagen type III), with a sharp drop on volumetric density in the elderly rats groups (18 and 24 months, $p<0,05$). Comparing the younger rats (3 to 12 months) *versus* the older animals (18 and 24 months), we observed a great decrease in the volumetric density of collagen type III ($p<0,05$). **Conclusions.** It was observed important alterations in the volumetric density of collagen type I, and notably, of collagen type III, in the urinary bladder of rats following the natural aging process. Occurred significant decrease in the volumetric density of collagen type III when comparing older *versus* younger rats, and the time when these changes occur more significantly was after 12 months of life of the animal.

Keywords: aging; urinary bladder; collagen.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS	15
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 GRUPOS.....	16
2.2 EXPERIMENTAÇÃO.....	17
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
3 ARTIGO CIENTÍFICO	21
4 CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS.....	35
DOCUMENTOS CONSULTADOS.....	39
APÊNDICES	40
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

Após os eventos que levam os seres vivos da concepção ao nascimento, e então à maturação sexual e a vida adulta, surge uma incapacidade de manter esses eventos progressivos e renovadores para sempre. Às manifestações decorrentes desta incapacidade, surge o conceito de envelhecimento.¹ Envelhecimento é, portanto, o acúmulo de diversas mudanças deletérias nas células e tecidos que ocorrem com o passar da idade, que inferem no aumento do risco de doenças e morte.² As alterações associadas a este processo podem ser atribuídas a defeitos no desenvolvimento ou genéticos, a mudanças relacionadas ao ambiente, doenças, ou a eventos inerentes, chamados de processo de envelhecimento.³ Assim, a imortalidade não pode existir, pois o processo de envelhecimento é inevitável, culminando na mortalidade dos seres.⁴

Apesar de diversas teorias terem sido formuladas para tentar responder a perguntas como “Por que envelhecemos?” ou “Como envelhecemos? ”, nenhuma delas parece ser inteiramente satisfatória.⁵ As teorias modernas para que tentam explicar este processo convergem para duas categorias principais: envelhecimento programado e por dano acumulado.⁶

A teoria do envelhecimento programado sugere que ocorra uma programação cronológica e pré-estabelecida, inerente aos organismos. Esta regulação depende das alterações na expressão genética que afetam os sistemas responsáveis pelas respostas de manutenção, reparo e defesa do organismo. Esta teoria pode ser dividida em três subcategorias: a) Longevidade programada, onde a senescência é o resultado de sequências de ativação/desativação de genes, e definida como o tempo que os déficits associados a idade são manifestados;⁵ b) Teoria Endócrina, onde o “relógio biológico” atua através de hormônios, como a via *Insulin/Insulin-Growth Factor-1*;⁷ c) Teoria Imunológica, onde o sistema imune é programado para perder função ao longo do tempo, o que leva a um aumento da vulnerabilidade a doenças infecciosas, além da perda da capacidade de diferenciação de proteínas próprias do organismo das estranhas, levando a consequente envelhecimento, adoecimento e morte. A desregulação do sistema imune é associada a doenças degenerativas cardiovasculares, esclerodermia, doença de Alzheimer e alguns tipos de neoplasias malignas, como os linfomas.^{8,9}

As teorias do dano acumulado propõem que o envelhecimento é ocasionado por fatores externo, envolvendo cinco linhas teóricas: a) Teoria do uso e desgaste, onde as células e tecidos tem partes vitais cujo uso repetitivo resulta em uma espécie de desgaste dos componentes, como propôs o Dr August Weismann em 1882; b) Teoria da taxa de metabolismo, sugerindo que quanto maior a taxa de metabolismo do organismo, menor sua sobrevida;¹⁰ c) Teoria dos radicais livres, postulando que a produção de radicais livres provenientes do metabolismo celular leva a danos moleculares, e o acúmulo desses danos acarreta decréscimo na atividade celular, encurtamento do tempo de vida, e à consequente morte do organismo¹¹; desde a década de 30, é conhecido o fato de que dietas restritivas prolongam o tempo de vida em animais de laboratório¹², e nos últimos anos esta teoria ganhou mais evidência com estudos que demonstraram que a restrição de oferta de glicose estimula a respiração mitocondrial e a formação de enzimas reparadoras antioxidantes, melhorando as defesas contra radicais livres, aumentando a sobrevida celular¹³; d) Teoria do dano acumulado ao DNA, que propõe que o DNA é continuamente danificado por alterações químicas tais como hidrólise e perdas proteicas, tanto por agentes externos e internos.¹⁴ As células respondem a estes danos através de mecanismos de reparo, assegurando a preservação da informação genética vital; entretanto, uma fração deste dano não pode ser reparada e se acumula, resultando em mutações, deleções, senescência, disfunção e morte celular.¹⁵ A redução do conteúdo de DNA nos telômeros dos cromossomos, que ocorre em cada divisão celular, poderia explicar a capacidade limitada de reparo e longevidade destas células; populações de células providas de enzimas que destituem tal encurtamento telomérico (as telomerasas), conferem um prolongamento no período de duração da replicação celular, como visto na células cancerígenas;^{16,17} e) Teoria das ligações cruzadas, indicando que o envelhecimento é resultado do acúmulo do dano cruzado de proteínas, células e tecidos, desacelerando os processos biológicos.^{18,19}

Nesta base teórica, e por vezes filosófica, a senescência poderia ser atribuída a “genes egoístas”⁵, pois notavelmente está associada com declínio da função em praticamente todos os sistemas.

A média de idade da população mundial está aumentando, e os principais fatores implicados nesta mudança em direção ao envelhecimento populacional são o declínio das taxas de natalidade e um aumento de cerca de 20 anos na expectativa

de vida durante o século XX. ²⁰ Mundialmente, a expectativa de vida ainda tende a aumentar mais 10 anos até 2050. ²⁰ No Brasil, o número de idosos (acima dos 60 anos) cresceu de 3 milhões de pessoas da década de 1960 para aproximadamente 14 milhões em 2002 (crescimento de aproximadamente 500% em 40 anos), com estimativa de chegarmos a 32 milhões de idosos até 2020.²¹ O aumento nos números de idosos, também eleva as demandas nos sistemas públicos de saúde, além de exigir mais dos serviços médicos e sociais. ²²

O trato urogenital também é afetado pelos mecanismos de envelhecimento, e diversos estudos avaliam estes fenômenos, tentando estabelecer correlações causais entre os eventos relacionados ao processo de envelhecimento, e seus subsequentes impactos clínicos e de morbi-mortalidade nos seres humanos. ²⁴⁻²⁸ Alguns estudos experimentais tem tentando avaliar alterações morfológicas, estruturais e histológicas da bexiga urinária aos eventos relacionados ao envelhecimento, mostrando que a bexiga urinária envelhecida apresenta alterações como aumento do peso, espessamento da parede vesical, afilamento da camada urotelial, redução da massa muscular e aumento do conteúdo colágeno. ²⁹⁻³¹

A bexiga urinária desempenha diversas funções importantes. Primeiramente, deve armazenar um volume socialmente adequado de urina, permitindo o acúmulo de volumes crescentes, sem apresentar aumento da pressão intra-vesical, em uma característica denominada complacência. Além disso, a musculatura lisa da bexiga e os receptores nervosos devem estar protegidos da exposição à urina por um epitélio especializado, o urotélio. E por fim, a bexiga urinária deve promover seu esvaziamento em uma ação coordenada entre contração da musculatura lisa (Músculo Detrusor) e o relaxamento da musculatura estriada do esfíncter urinário externo, para que a urina seja expelida. ³²

Anatomicamente, a bexiga pode ser dividida em duas partes principais: o corpo, localizada acima dos orifícios ureterais, e a base, consistindo no trígono vesical, junção uretero-vesical e a parede anterior da bexiga (Figura 1). ³² A bexiga é um órgão muscular oco, e a estrutura da parede vesical consiste em quatro partes distintas: a) camada mais interna, delineada pela camada urotelial; b) a lâmina própria, composta principalmente por tecido conectivo denso e irregular, fibroblastos e uma fina camada de muscular da mucosa, circundados por c) uma camada externa de musculo liso (Músculo Detrusor), com fibras bem organizadas em feixes e com tecido conjuntivo,

rico em colágeno e elastina, envolvendo seu perimísio e d) uma camada adventícia externa de tecido conjuntivo frouxo.³³ Três camadas de musculatura lisa são descritas, sendo que as camadas interna e externa tem orientação longitudinal de suas fibras, enquanto na camada intermediária o direcionamento das fibras é circular.³²

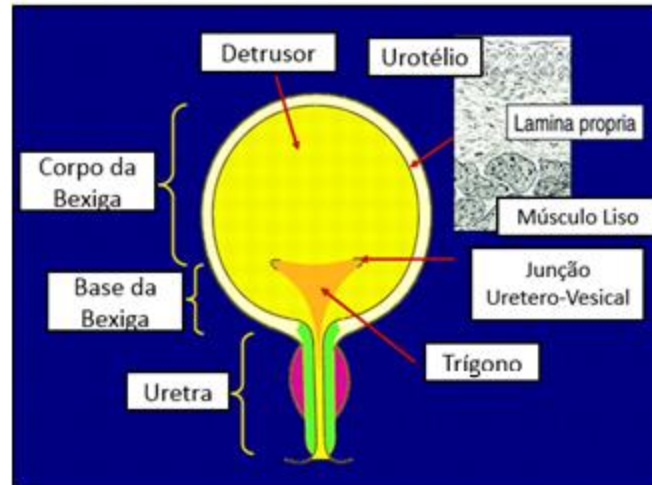


FIGURA 1. DESENHO ESQUEMÁTICO DA BEXIGA. FONTE: ANDERSSON (2004) (Adaptado da *Physiological Reviews*, Vol. 84, p. 936, 2004. Copyright by The American Physiological Society, Bethesda)

Os vários componentes da bexiga desempenham papéis especializados e integrados para a correta execução das funções. A camada muscular (músculo detrusor) é composta por células musculares lisas, com aspecto fusiforme, e mantém níveis estáveis de tensão que podem ser modulados por hormônios circulantes, fatores locais como óxido nítrico, ou pela atividade nervosa autonômica.³² Em resposta à acetilcolina liberada pelos nervos parassimpáticos, os receptores muscarínicos M3, através do influxo de cálcio para o ambiente intracelular, induzem a contração do músculo detrusor.³² As junções intercelulares entre as células musculares lisas da bexiga conferem a característica de baixa propagação intercelular dos estímulos elétricos entre estas células, sendo esta propriedade importante para a estabilidade da bexiga durante a fase de enchimento.³⁴ Além das células musculares e intersticiais, a parede da bexiga é composta por tecido conectivo estromal, cujos principais constituintes são as proteínas colágeno e elastina, além dos fibroblastos. A camada estromal e o colágeno são intrinsecamente ligadas às propriedades elásticas

da bexiga e adaptação da bexiga às diferentes situações patofisiológicas, com implicações em propriedades básicas da bexiga como acomodação de volume e complacência.³⁵⁻³⁷

O colágeno é o maior componente estrutural da matriz extracelular e representa aproximadamente 25% da proteína corporal total. As moléculas de colágeno se consistem em três cadeias de polipeptídeos (cadeias- α) idênticas ou similares, as quais formam uma hélice tripla. A hidroxiprolina é reconhecida como um aminoácido exclusivo do colágeno, sendo indispensável para a estabilização da tríplice hélice da proteína.³³ O colágeno tipo III é mais comumente encontrado em tecidos moles, tais como vasos sanguíneos, derme e fáscia, além de estar presente em maior quantidade no tecido cicatricial.³⁸ Uma das características físicas que distinguem os colágenos do tipo I e do tipo III é a forma de entrelaçamento de suas fibras. As fibras do colágeno tipo I são mais bem entrelaçadas e compactadas, formando feixes de fibras grossas (2-10 μm), enquanto o colágeno tipo III forma fibras individuais mais finas (0,5-1,5 μm).³⁹

O colágeno do tipo I é a proteína estrutural mais comumente encontrada no corpo, e também é o mais abundante na bexiga, onde os principais encontrados são os tipos I e III, que correspondem a 97% do colágeno da bexiga, além do colágeno tipo IV.^{32,33, 35} O colágeno tipo I corresponde a aproximadamente 75% do colágeno presente na bexiga, enquanto o colágeno tipo III corresponde a 25%, estabelecendo uma relação de colágeno tipo III:tipo I de 1:3.³⁵ A maior parte do colágeno presente na bexiga é distribuída no tecido conectivo localizado fora dos feixes musculares, no perimísio.

Análises de seções histológicas bidimensionais em órgãos tridimensionais resultam em perda da quantidade e qualidade da informação estudada. O problema em estimar parâmetros estruturais de um órgão tridimensional através de cortes histológicos bidimensionais pode ser resolvido através do uso da estereologia, que combina técnicas matemáticas e estatísticas à análise histológica.^{40, 41} O princípio de Delesse, cardinal nos estudos estereológicos, orienta que, para estruturas isotrópicas (como a bexiga urinária), ao analisarmos cortes desta estrutura para estudo de um objeto específico, a obtenção da medida da área ocupada por este objeto em relação à área total da estrutura, permite conhecer, sem viés, o volume desse componente em relação ao próprio volume da estrutura (densidade de volume).⁴² Análise

estereológica de alterações histológicas da bexiga e outros órgãos tem sido utilizada em estudos relacionados ao envelhecimento e alterações em doenças degenerativas e neoplasias malignas.^{31,43-45}

As fibras colágenas, por serem ricas em aminoácidos básicos, reagem fortemente a corantes ácidos.³⁹ O corante Sirius Red F3BA é um corante que reage fortemente ao colágeno, e por isso a técnica de coloração Picrosirius (utilizando o corante Sirius Red, e a técnica de ácido pícrico) é um procedimento específico para o colágeno, além de ocorrer aumento de até 700% na intensidade da luz devido à birrefringência do colágeno corado pela técnica Picrosirius.⁴⁶ O espectro das diferentes cores na análise com luz polarizada obtidas depois da coloração com Picrosirius é útil na diferenciação entre os vários tipos de colágeno. Na observação com luz polarizada, as fibras com maior entrelaçamento e maior espessura apresentaram coloração laranja-avermelhada e foram denominadas colágeno do tipo I. As fibras mais afiladas e menos entrelaçadas apresentaram coloração esverdeada e foram denominadas colágeno tipo III.^{39, 47}

Revisões de literatura documentam que há relação entre o envelhecimento e o decréscimo na capacidade da bexiga em perfazer seu ciclo normal de enchimento, armazenamento e esvaziamento, manifestando-se como complacência reduzidas, aumento do resíduo vesical pós-miccional, além de hiperatividade detrusora, contratilidade prejudicada, ou a combinação de ambos.⁴⁸⁻⁵³ Zhao e colaboradores, em 2010, em estudo experimental comparando ratos jovens com ratos considerados idosos, mostraram que estes apresentam capacidade vesical, volume de urina residual pós-miccional e atividade detrusora espontânea aumentados, além de menor resposta ao estímulo muscarínico, correlacionando dados experimentais com humanos, e provando que modelos animais com ratos Fischer/Brown Norway são bons modelos para estudos de mudanças funcionais da bexiga relacionadas ao envelhecimento.⁵⁴

Embora reconheçamos as alterações fisiológicas da bexiga urinária no processo de senescência, bem como a importância do tecido conectivo e do colágeno para o desempenho normal do órgão, pouco sabemos sobre quais são as modificações estruturais, além da correlação entre estas alterações e os eventos clínicos e funcionais sofridos pela bexiga no processo natural de envelhecimento.

1.1 OBJETIVOS

O presente estudo foi proposto com os seguintes objetivos:

- Descrever e quantificar as modificações histológicas relacionadas aos colágenos tipos I e III no processo natural de envelhecimento da bexiga urinária.
- Estabelecer o momento do processo de envelhecimento em que ocorrem modificações significativas do colágeno da bexiga urinária.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo é derivado de um projeto previamente aprovado e intitulado “Avaliação anátomo-fisiológica do envelhecimento urogenital masculino”. Todos procedimentos deste estudo seguiram os preceitos éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as exigências do Canadian Concil on Animal Care, além de verificados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o processo número 23075.032620/2010-10.

2.1 GRUPOS

Considera-se um animal idoso quando sua capacidade reprodutiva é reduzida, o que ocorre entre 15 e 20 meses para os ratos da raça Wistar.⁵⁴ A partir dessas informações desenhamos o modelo animal deste estudo. Foram utilizados 72 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), do sexo masculino. Esses animais foram todos mantidos em gaiolas de polietileno com medidas de 60 x 50 x 22cm, distribuídos em 3 animais por gaiola, devidamente identificadas com o nome do experimento e data de nascimento dos animais (Fotografia 1), com umidade e temperatura (22 graus Celsius) controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas, livre de ruídos externos. Receberam água filtrada e ração comercial padrão específica para a espécie (Nuvilab - Nuvital® – Colombo, Paraná, Brasil), *ad libitum* durante todo o período do experimento.

Os ratos foram divididos em 6 grupos de 12 animais cada, sendo então sacrificados conforme o tempo os diferentes tempos de vida de cada grupo:

- Grupo 1: 90 dias de vida (3 meses)
- Grupo 2: 180 dias de vida (6 meses)
- Grupo 3: 270 dias de vida (9 meses)
- Grupo 4: 360 dias de vida (12 meses)
- Grupo 5: 540 dias de vida (18 meses)
- Grupo 6: 720 dias de vida (24 meses)

2.2 EXPERIMENTAÇÃO

A etapa experimental foi realizada no Departamento de Anatomia do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, PR). Os animais com a idade correspondente ao determinado para elaboração dos diferentes grupos foram transportados para um local distante da sala de que seriam sacrificados, em um local calmo, e então levados um por vez em gaiola individual até o laboratório.

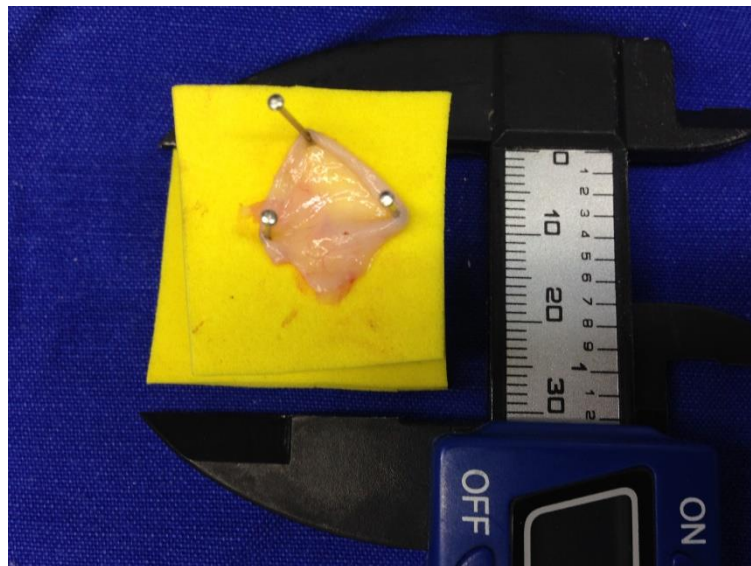
Na sala de experimentação, foi realizada aferição dos dados corporais do animal: peso (realizada em balança calibrada ultrassensível), estatura (medição com paquímetro digital) e cálculo do Índice de Massa Corpórea, através da fórmula: peso (em gramas) /estatura (em cm²).

Foram então submetidos à anestesia com solução de Cloridrato de Cetamina (57,67mg/ml) associado a 2% de Cloridrato de Xilazina (0,2g/10 mL), com aplicação de 1ml/1000 gramas de peso vivo, via intraperitoneal. Após anestesiados, os animais foram fixados em tábua cirúrgica e submetidos a antissepsia abdominal e torácica, seguido de incisão mediana tóraco-abdominal (Fotografia 1), localizando primeiramente o coração, onde foi realizada coleta de 5-10 mL de amostra sanguínea para dosagem de testosterona, creatinina e uréia (dados utilizados para realização de outras pesquisas do grupo de estudo em envelhecimento), incisão no átrio direito, com consequente exsanguinação e óbito. A seguir, prosseguiu-se a retirada completa da bexiga urinária, além da extração de outros órgãos como rins, testículos, fígado, pênis, cérebro, coração e a artéria aorta, para uso em outros estudos.



FOTOGRAFIA 1: INCISÃO MEDIANA TÓRACO-ABDOMINAL. FONTE: O Autor

Imediatamente após a dissecação e remoção da bexiga, as mesmas foram abertas longitudinalmente, estabilizadas sobre fragmento de polímero emborrachado de Etil, Vinil e Acetato (EVA – Fotografia 2), submersas e fixadas em Bouin (ácido pícrico, formol e ácido acético) por 24 horas.



FOTOGRAFIA 2: BEXIGA URINÁRIA APÓS RETIRADA E ABERTURA LONGITUDINAL. FONTE: O Autor.

Após a fixação, as peças permaneceram em álcool 70%, e em seguida esse material foi desidratado em uma série decrescente de xilol e álcoois (solução de xilol

1, solução de xilol 2, solução de álcool etílico absoluto e xilol, álcool absoluto 1,2 e 3, álcool 95%, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70%, água corrente, água destilada; 1 a 2 horas em cada solução). Concluídas estas etapas, as bexigas urinárias foram então incluídas em parafina e emblocadas, para então serem submetidas aos cortes sucessivos em micrótomo com 5µm de espessura (American Optical, Spencer AO 820). Os cortes foram então montados em lâminas e corados pelo método Picrosírius (solução de Sirius Red F3BA a 0,1% e solução aquosa saturada de ácido pícrico por aproximadamente 60 minutos), para identificação das fibras colágenas da bexiga e análise estereológica.

As fibras colágenas mais espessas, fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em tons de laranja, amarelo e vermelho e representam o colágeno tipo I, enquanto que as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringente, apresentam-se coradas em verde, representando o colágeno tipo III.

A área ocupada pelas fibras colágenas tipo I e III da bexiga foi analisada com o auxílio do microscópio óptico, de luz polarizada, biológico plano 0.I, Polaris – B.photonics vinculado a um computador B-XTreme, processador intelG2030 Dual Core com câmara digital colorida sistema CMOS e sistema de captura de imagem Home Mirage I.

Foram capturadas as imagens de 10 campos histológicos, aleatórios, de cada lâmina histológica da bexiga de todos os animais estudados, com aumento de 400 vezes para a análise quantitativa das fibras colágenos tipos I e III corados com Picrosírius Red e analisados em microscopia com luz polarizada.

As imagens congeladas e digitalizadas das fibras colágenas tipo I e tipo III foram analisadas por meio do aplicativo Image Pro-plus, versão 4.5 da Cybernetics® para Windows em computador Pentium III.

Todos os valores obtidos foram transformados em porcentagem (%) para a obtenção da densidade volumétrica (frequência relativa) das estruturas em estudo.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente foram calculados os valores médios de colágenos dos tipos I e III para cada rato como sendo a média dos valores dos 10 campos avaliados. Os valores médios de colágenos dos ratos foram descritos segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo). Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas que atenderam a condição de normalidade e comparados entre os grupos com uso de análises de variâncias (ANOVA), seguidas de comparações múltiplas de Tukey, para identificar entre quais grupos ocorreram as diferenças nos tipos de colágenos. Para os valores de p obtidos foram considerados estatisticamente significantes os valores menores que 0,05. Para as análises, foram utilizados os *softwares* Microsoft Excel 2013 e Softonic SPSS Statistics 20.0.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados e discussão da tese foram submetidos para análise e publicação no periódico científico *The Journal of Urology*®, jornal científico oficial da *American Urological Association* (fator de impacto 3.753 pela *Thompson Reuters Institute for Scientific Information Journal Citation Reports*, em 2014) – anexos.

STEREOLOGICAL STUDY OF COLLAGEN IN THE AGING OF URINARY BLADDER IN RATS

INTRODUCTION

After the events that lead living beings from conception to birth and then to sexual maturity and adult life comes an incapacity to keep these events progressive and forever renewing.¹

The urogenital tract, including the urinary bladder, is also affected by aging mechanisms. This organ must play the role of storing socially adequate and adding volumes of urine keeping its pressure constant (characteristic denominated compliance), and finally be emptied voluntarily under low pressure and low resistance to urinary flow.^{2,3}

The bladder is a hollow organ, and the structure of its wall consists in four distinct parts: a) an inner layer, delineated by the urothelium; b) the lamina propria, composed mainly by irregular and dense connective tissue, fibroblasts and a thin layer of muscularis propria surrounded by c) an external layer of smooth muscle (detrusor muscle), with fibers well organized in bundles and connective tissue rich in collagen and elastin involving its perimysium and d) an adventitious external layer of loose connective tissue.^{4,5}

The many components of the bladder play specialized and integrated roles for the correct performance of functions. The connective tissue and the collagen are intrinsically connected to the elastic properties of the bladder and adaptation of bladder to different pathophysiological situations, with implications in basic properties of the bladder like accommodation of volume and complacence.^{2,6-8}

Some experimental studies are trying to correlate morphological, structural and histological alterations in urinary bladder to events related to aging demonstrating that the aged urinary bladder shows functional alterations like reduced complacency, increase of after post-volume residues as well as detrusor hyperactivity, impaired contractility or the combination of both.⁹⁻¹² Although it is recognized functional alterations of urinary bladder in aging as well as the importance of connective tissue

and collagen to normal bladder functions, little is known about which are the structural alterations suffered by bladder in the aging process along with the correlation between these alterations to clinical and functional events related to the urinary bladder aging.

In the aim of this article is to describe and quantify the histological modifications related to collagen types I and III in the process of aging urinary bladder.

MATERIALS AND METHODS

Experimentation. The study was previously approved by the Ethic Comission of the Institution according to the demands of the Canadian Council on Animal Care. Seventy two albino male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia) were used. These animals were all kept in cages of polyethylene measuring 60 x 50 x 22 cm, distributed in 3 animals per cage. The animals were kept with controlled moist and temperature in 22 Celsius degree, with a cycle of bright/dark of 12 hours, free from external noise. They received *ad libitum* filtered water and commercial feed specific for the specie.

The rats were divided in 6 groups of 12 animals each, and then sacrificed according to the different ages in each group: Group 1 with 3 months, Group 2 with 6 months, Group 3 with 9 months, Group 4 with 12 months, Group 5 with 18 months and Group 6 with 24 months.

At the established lifetime, the biometric data from the animals were obtained (weight, stature and body mass index using formula with weight in grams/stature in cm²).

They were then submitted to anesthesia with a solution of ketamine (57,67 mg/ml) associated with 2% of Xylazine Hydrochloride(0,2g/10 mL), applying 1mL/1000 grams of living weight, intraperitoneally. After anesthetized the animals were fixed in surgical board and submitted to abdominal and thoracic antisepsis followed by thoracic and abdominal medium incision, finding the heart and incising the right atrium, with consequent bleeding and death by exsanguination. Immediately after the cardiorespiratory arrest, the urinary bladder was fully removed, as well as other organs like kidneys, testicles, liver, penis, brain, heart and aorta artery (those used in other studies).

Immediately after the dissection and removal of the bladder, they were opened longitudinally, submersed and fixated in Bouin (picric acid, formol and acetic acid) for 24 hours. After fixation, the pieces remained in alcohol 70%, and then dehydrated in a decreasing series of xylol and alcohols (solution of xylol 1, solution of xylol 2, solution of absolute ethylic alcohol and xylol, absolute alcohol 1, 2 and 3, alcohol 95%, alcohol 90%, alcohol 80%, alcohol 70%, running water, distilled water, 1 to 2 hours in each solution). When these phases were complete the urinary bladder were then included in paraffin and transformed in blocks to then be submitted to successive cuts in microtome with 5 µm thickness (American Optical, Spencer AO 820). The cuts were then put together in slides and stained using the Picrosirius method (solution of Sirius Red F3BA in 0,1% and aqueous saturated solution of picric acid by approximately 60 minutes) to identify the collagen fibers of the bladder and stereological analyses.

The thicker collagen fibers, strongly birefringent, showed themselves colored in orange, yellow and red tones and represent the collagen type I, while the thinner and disperse fibers weakly birefringent showed themselves colored in green, representing collagen type III. Other elements of the bladder wall, that not the collagen, showed themselves in black color.

The area occupied by the collagen fibers type I and III of the bladder were analyzed with an optical microscope of polarized light, biologic plan 0.1, (Polaris – B. photonics) bound to a computer B-XTreme with IntelG2030 Dual Core processor with digital colored camera with CMOS system and Home Mirage I image capture system.

The images were captured in 10 histological fields, random, of each histological slide of the bladder of all of the studied animals with an increase of 400 times for quantitative analyses of collagen fibers types I and III colored with Picrosirius Red and analyzed in microscopy with polarized light.

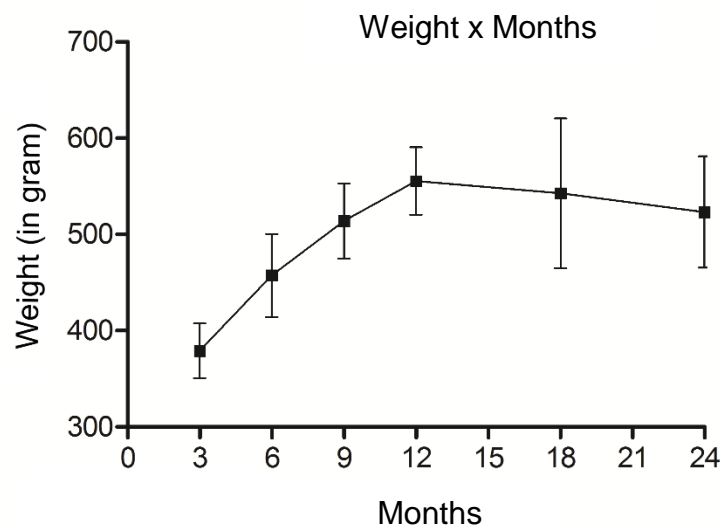
The frozen and digitalized images of the collagen fibers type I and type III were analyzed using the app Image Pro-plus, version 4.5 of Cybernetics® for Windows in Pentium III computer.

All obtained values were transformed in percentages (%) to obtain the volumetric density (relative frequency) of studied structures.

Statistical Analysis. First, the medium values of collagen types I and III were calculated for each rat like being the average of the value of 10 fields evaluated. The medium values of collagen of rats were described in groups using summary measures (average, standard deviation, median, minimum and maximum). To compare the groups, regarding the quantitative variables with normal distribution, and compare the groups, it was used analysis of variances (ANOVA), followed by multiple comparisons of Tukey, to identify among which groups occurred the differences in types of collagen. It were considered statistically significant the values of p lower than 0,05.

RESULTS

There were no loses during the study. The animals of the elder group showed clear signs of aging such as rarefaction of hairs and underactive. As to biometric data the animals had an increasing in its weight until 12 months followed by a discreet reduction in the last groups, which led to stability in the body mass index (Graphic 1).



Graphic 1. Weight *versus* months results

Table 1 brings results referring volumetric densities (relative frequency) of collagen type I and from collagen type III. The highest volumetric density of collagen type I occurred in the group of 12 months, with an average of 19,81% in structure

composition of the bladder wall of collagen type I, whilst the lowest volumetric density of collagen type I occurred in the group of 6 months (8,08%). For the collagen type III the maximum average volumetric density was at 9 months group, with 3,62% of structural composition of bladder being collagen type III, and then a sharp drop of volumetric density in groups of older rats (18 and 24 months), reaching the minimum volumetric density for collagen type III at 24 months. These differences in the collagen type III between the younger and the older groups among maximum volumetric density (9-months group) and minimum values (24-months groups) are exemplified in Figure 1.

Table 1. Description of average values of collagen according to groups and results of ANOVA.

	Group	Average %	SD	Median	Minimum	Maximum	N	p
Type-I Collagen	3 months	14,82	4,57	15,19	7,68	20,70	12	<0,001
	6 months	8,08	3,27	6,34	4,55	13,87	12	
	9 months	8,62	3,82	6,98	4,55	14,47	12	
	12 months	19,81	5,49	19,03	12,02	34,01	12	
	18 months	10,29	1,24	10,78	7,89	11,91	12	
	24 months	8,87	2,02	9,14	4,93	11,21	12	
Type-III Collagen	3 months	2,13	1,27	1,91	0,36	4,27	12	<0,001
	6 months	3,39	0,97	3,30	2,34	5,82	12	
	9 months	3,66	1,16	3,48	2,34	5,82	12	
	12 months	3,42	1,17	3,39	1,09	4,88	12	
	18 months	0,68	0,32	0,62	0,36	1,25	12	
	24 months	0,12	0,24	0,01	0,00	0,84	12	

ANOVA

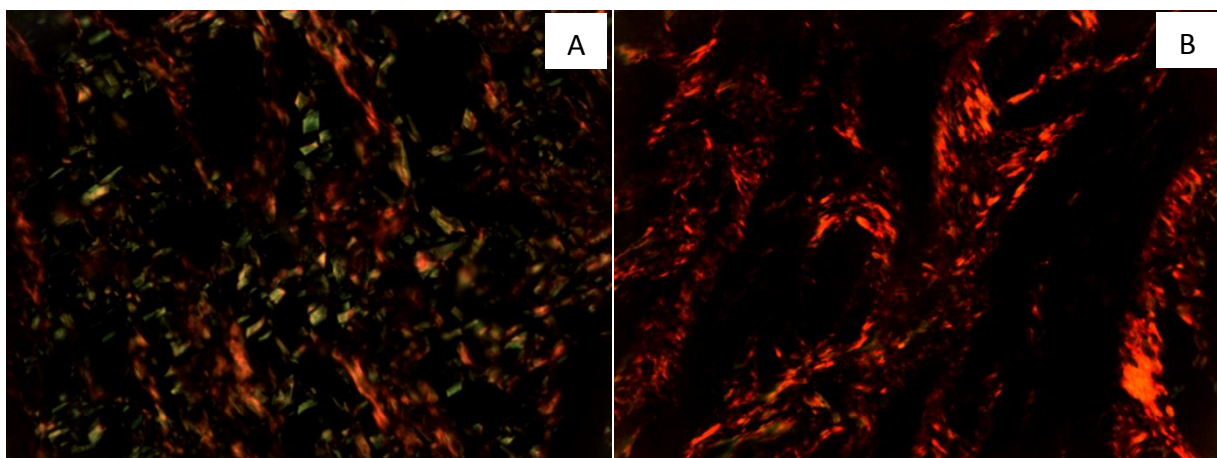
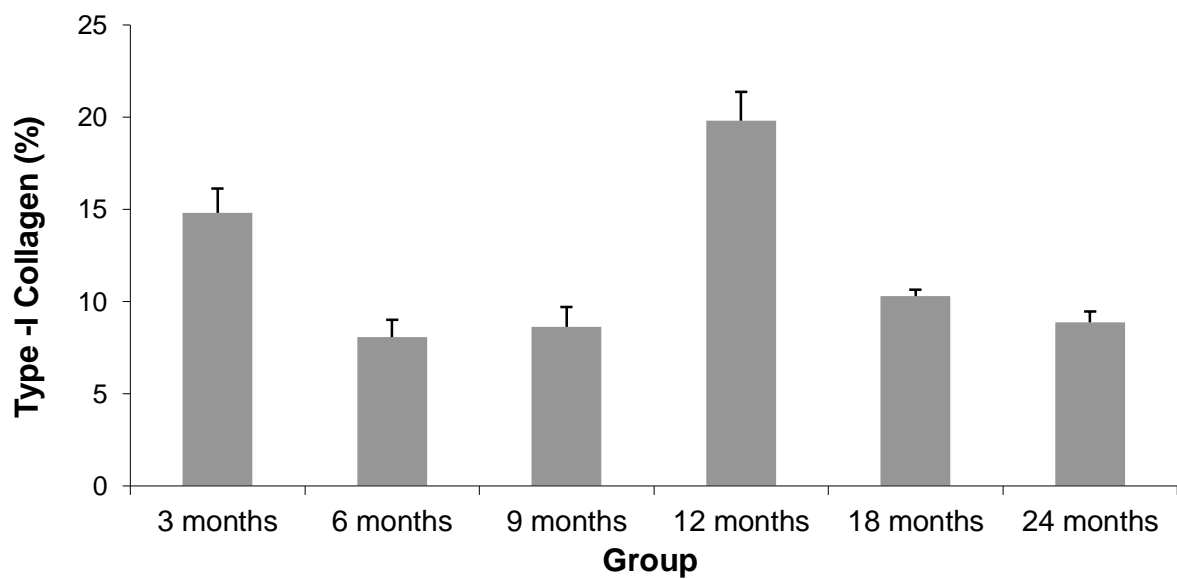


Figure 1. Microscopic analysys under polarized light of bladder wall structure using Picrosirius. The green points represent collagen type III. Differences seen in collagen

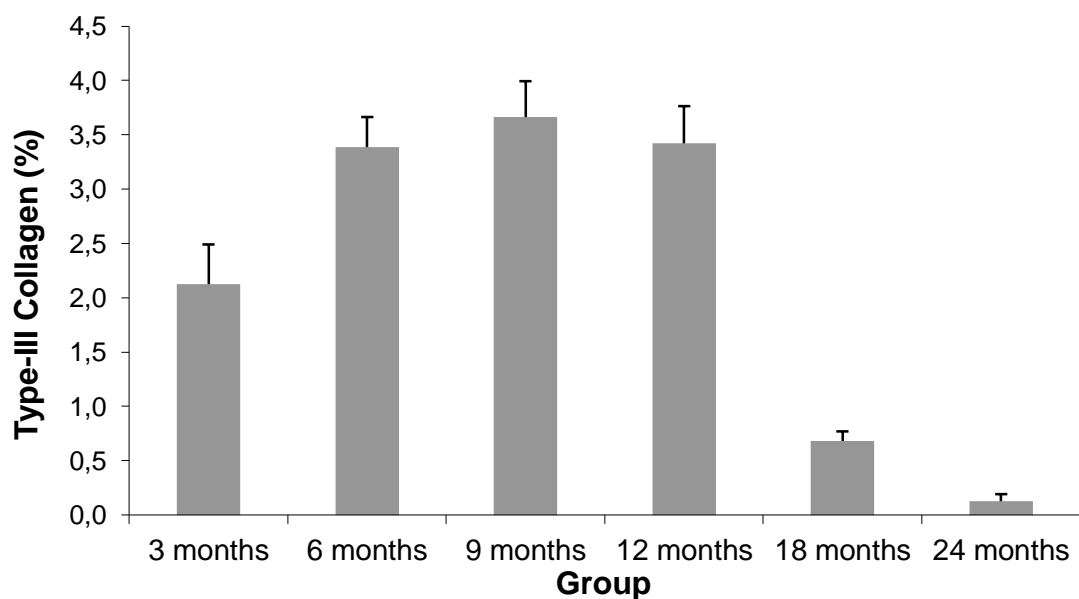
type III between the 9-months group (A), at maximum volumetric density, *versus* minimum volumetric density seen on 24-months group (B).

Graphics 2 and 3 illustrate the results presented in Table 1 the difference being visible the difference in volumetric densities of collagen type I and type III among groups.

Graphic 2. Average values of collagen type I and respective standard deviation.



Graphic 3. Average values of collagen class III and respective standard deviation according to groups.



In table 2, the relative frequency of collagen types I and III is exposed through multiple comparisons among groups. In the groups of 3 and 6 months there was an statistically significant increase of collagen type III; it is also noted an increase of collagen type III among the groups 6 to 9 months, and then a slight decrease in the 12-months group, however, with no statistical significance. When comparing groups of younger rats (from 3 to 12 months) to older rats (18 to 24 months), it is noticed a significant decrease of volumetric density of collagen type III ($p < 0,05$). For collagen type I, the highest relative frequency occurred at 12 months, also suffering a decrease among the groups of young adult rats to the older (groups 18 and 24 months, $p < 0,05$).

Table 2. Multiple comparisons (Tukey) of average values of collagen among groups.

Comparation			Average difference	Standard error	p	CI (95%)	
						Inferior	Superior
Type-I Collagen	3 months - 6 months	6,74	1,51	<0,001	2,31	11,17	
	3 months - 9 months	6,20	1,51	0,002	1,77	10,63	
	3 months - 12 months	-4,99	1,51	0,018	-9,42	-0,56	
	3 months - 18 months	4,54	1,51	0,042	0,11	8,97	
	3 months - 24 months	5,95	1,51	0,003	1,52	10,38	
	6 months - 9 months	-0,54	1,51	0,999	-4,97	3,89	
	6 months - 12 months	-11,73	1,51	<0,001	-16,16	-7,30	
	6 months - 18 months	-2,21	1,51	0,688	-6,64	2,22	
	6 months - 24 months	-0,79	1,51	0,995	-5,22	3,64	
	9 months - 12 months	-11,19	1,51	<0,001	-15,62	-6,76	
	9 months - 18 months	-1,67	1,51	0,877	-6,10	2,76	
	9 months - 24 months	-0,25	1,51	>0,999	-4,68	4,18	
	12 months - 18 months	9,52	1,51	<0,001	5,09	13,95	
	12 months - 24 months	10,94	1,51	<0,001	6,51	15,37	
	18 months - 24 months	1,42	1,51	0,935	-3,01	5,85	
Type-III Collagen	3 months - 6 months	-1,26	0,39	0,022	-2,40	-0,12	
	3 months - 9 months	-1,53	0,39	0,003	-2,67	-0,40	
	3 months - 12 months	-1,30	0,39	0,017	-2,44	-0,16	
	3 months - 18 months	1,45	0,39	0,005	0,31	2,59	
	3 months - 24 months	2,00	0,39	<0,001	0,86	3,14	
	6 months - 9 months	-0,28	0,39	0,980	-1,41	0,86	
	6 months - 12 months	-0,04	0,39	>0,999	-1,18	1,10	
	6 months - 18 months	2,71	0,39	<0,001	1,57	3,85	
	6 months - 24 months	3,26	0,39	<0,001	2,12	4,40	
	9 months - 12 months	0,24	0,39	0,990	-0,90	1,38	
	9 months - 18 months	2,98	0,39	<0,001	1,84	4,12	
	9 months - 24 months	3,54	0,39	<0,001	2,40	4,68	
	12 months - 18 months	2,74	0,39	<0,001	1,61	3,88	
	12 months - 24 months	3,30	0,39	<0,001	2,16	4,44	
	18 months - 24 months	0,55	0,39	0,709	-0,58	1,69	

DISCUSSION

The median age of the world's population is increasing, and the factors implied in this shift towards aging is related to the decline in fertility and a 20-year increase in the average life span during the 20th century, and worldwide, the average life span is expected to extend another 10 years by 2050.¹³ In Brazil, the number of older adults increased from 3 million in the 1960's to 14 million in 2002 (a 500% growth in 40 years), and there is estimative of reaching 32 million people in 2020¹⁴. The growing number of older adults increases demands on the public health system and on medical and social services.¹⁵

Almost every physiologic system has its function diminished with the aging process^{16,17}, and concerning the urinary tract, this is not different.¹⁸ Clinical urodynamic studies have demonstrated advancing age to be associated with a reduced bladder capacity, an increase in uninhibited contractions, decreased urinary flow rate, and increased postvoid residual urine volume.^{19,20} The aging bladder specifically may be described as manifesting detrusor overactivity, impaired contractility, or a combination of both.²¹

Zhao et al, using Fischer/Brown Norway rats, revealed that even when external factors remain constant, at the onset of the aging process, rat bladders showed increased on bladder capacity, post-residual volume and micturition frequency, with decreased micturition pressure, when comparing old versus young rats. These findings are similar to the findings in aging human bladders, which validated the animal model in bladder aging studies.²² In the presented study, the animals of the last group reached the last of their lifetime with 720 days, therefore based on their cycle of life, they can be considered elder rats.²³ The development of the animals on the subject of their weight was considered adequate regarding the deviation pattern curves found in literature.²⁴

Even that we know that the viscoelastic properties of the bladder are intimately related to the Types I and III collagen, that seem to be the most abundant collagen types that influence function of the lower urinary tract^{2,4,25}, we do not know exactly how this structural components behave during the aging process, even though some studies tried to describe these alterations occurring during pathological states.

Previous studies have demonstrated that collagen synthesis and deposition are increased in organ fibrosis such as myocardial fibrosis and fibrotic diseases of the skin ^{26,27}, and it is generally accepted that in the early stages of a fibrotic lesion there is enhanced synthesis of collagen type III, while type I collagen synthesis predominates at later stages.⁴ Histologic and biochemical studies have shown that non-compliant bladder are characterized by an abnormal deposition of extracellular matrix protein in the muscular layer of the bladder wall.^{28,29} Deveaud and colleagues, in a molecular analysis of collagens using immunohistochemical localization of collagen subtypes in a pediatric subset of population with “non-compliant” bladders (neurogenic and non-neurogenic) detailed that in this states of pathologic conditions, there is an increase in total collagen deposition, an increase in the type III:type I ratio (from 1:3 in normal bladders to 1:2 in non-compliant bladders), and clearly increase in type III collagen fibers, of almost 48%, mainly by infiltrating these fibers into the detrusor muscle layer, with a thickened perimysial and endomysial connective tissue infiltration, showing that not only occurs an increasing in type III collagen rates, but also there is a modification in the distribution of this collagen, being hypothesized a major role of collagen type III in the bladder dysfunctions. ⁴ Using a model of obstructed bladder in young rabbits, Tekgul et al reported an increasing in deposition of type-I collagen between the muscular bundles, and an increased staining for type-III collagen in and around the muscular bundles.³⁰

The mechanism by which collagen accumulates has not been completely elucidated. Collagen deposition may be the result of increased protein synthesis, decreased degradation, or a combination of both. Kaplan et al, studying pediatric patients with urodynamically proven non-compliant bladders, using a reverse transcription-polymerase chain reaction technique to quantify messenger RNA (mRNA) have shown that type III collagen mRNA levels are increased in these fibrotic sets, stating that the accumulation of type III collagen protein is transcriptionally regulated.² Deveaud et al described that the steady levels of mRNA of both procollagen types I and III in non-neurogenic non-compliant bladders are increased, but only occurred an increased deposition of type III collagen, with no alteration on protein levels of type I collagen in this subset of patients, suggesting that besides the genetic mechanisms regulating fibrotic deposition in non-compliant non-neurogenic bladders, that should be a post-transcriptional mechanism of protein synthesis regulation operating in this population.⁴ So, further studies will be required to elucidate the mechanism of cell response that alters collagen expression.

It is worth mentioning that these studies, about structural alterations of bladder wall, were described during pathologic processes of the bladder (obstruction, neurogenic bladder). Our study is observational, about the events regarding the quantitative alterations to collagen types I and III during the natural aging process, and this process does not necessarily means getting sick ¹, demonstrating the importance of our study in opening new boarders for the discussion of aging mechanisms of the urinary bladder and urogenital tract.

Alterations in the deposition of collagens type I and III volumetric density occurred along the age curve of studied groups. Although it has not been possible to establish a pattern in these alterations for collagen type I, notably there were alterations that followed a pattern in the case of collagen type III. In groups of 3 and 6 months, there was a significant statistic increase in collagen type III; it is also noted an increase of collagen type III among groups of 6 and 9 months and a discreet reduction of the type III collagen relative frequency among groups of 9 and 12 months; however, these alterations did not reach statistical significance denoting a stability in this range (between 6 and 12 months). In the older rats groups (18 and 24 months) there was an abrupt drop in the volumetric density of type III collagen, with statistic difference among the older groups versus younger, showing that the significant alteration point of type III collagen towards the decrease of its relative frequency occurred from the group of 12 months. In aged rats, not necessarily affected by pathological processes of the urinary bladder there was a reduction in the deposition of type III collagen. It was not the goal of this article to correlate the alterations of types I and III collagen with eventual functional alterations of the urinary bladder in aging, and with the data showed either is possible to establish this correlation. However, there is a new vision in the discussion about the structural alterations that follow the process of aging.

CONCLUSIONS

There are significant alterations in the volumetric density of collagens type I and, notably, type III, in the urinary bladder of rats with the natural process of aging. We observed a decrease in volumetric density of collagen type III when comparing younger *versus* older rats, and the moment these alterations occur in a most significant way is from the 12 months lifetime of the animal.

REFERENCES

1. Hayflick L. How and why we age. *Exp Gerontol* 1998;33(7-8):639-53
2. Kaplan EP, Richier JC, Howard PS, Ewalt DH, Lin VK. Type III collagen messenger RNA is modulated in non-compliant human bladder tissue. *J Urol* 1997; 157:2366-69.
3. Chang SL, Howard PS, Koo HP, Macarak EJ. Role of type III collagen in bladder filling. *Neurourol Urodyn* 1998; 17(2):135-45.
4. Deveaud CM, Macarak EJ, Kucich U, Ewalt DH, Abrams WR, Howard PS. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. *J Urol.* 1998; 160(4):1518-27.
5. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2004; 84(3):935-86
6. Macarak EJ, Howard PS: The role of collagen in bladder filling. *Adv Exp Med Biol* 1999; 462:215-223.
7. Chang SL, Chung JS, Yeung MK, Howard PS, Macarak EJ. Roles of the lamina propria and the detrusor in tension transfer during bladder filling. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1999;201:38-45.
8. Stevenson K, Kucich U, Whitbeck C, Levin RM, Howard PS. Functional changes in bladder tissue from type III collagen-deficient mice. *Mol Cell Biochem* 2006;283(1-2):107-14.
9. Resnick NM, Yalla SV. Detrusor hyperactivity with impaired contractile function. An unrecognized but common cause of incontinence in elderly patients. *JAMA* 1987;257:3076-3081.
10. Ameda K, Sullivan MP, Bae RJ, Yalla SV. Urodynamic characterization of nonobstructive voiding dysfunction in symptomatic elderly men. *J Urol* 1999;162:142–146.
11. Siroky MB. The aging bladder. *Rev Urol* 2004; 6 Suppl 1:S3-7
12. Hashim H, Abrams P. Overactive bladder: an update. *Curr Opin Urol* 2007;17:231.
13. United Nations. Report of the Second World Assembly on Aging. Madrid, Spain: United Nations, April 8-12, 2002.
14. Lima-Costa MF, Veras R. Envelhecimento e saúde pública. *Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro* 2003; 19(3): 700-1.
15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trends in aging--United States and worldwide. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; 52(6):101-4, 106.
16. Geokas MC, Contreas CN, Majumdar AP. The aging gastrointestinal tract, liver, and pancreas. *Clin Geriatr Med* 1985;1:177–205.
17. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, et al. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 1993;88:77–81.

18. Diokno AC, Brock BM, Brown MB, Herzog R. Prevalence of urinary incontinence and other urological symptoms in the noninstitutionalized elderly. *J Urol* 1986;136:1022–1025.
19. Diokno AC, Brown MB, Goldstein NG, Herzog AR. Urinary flow rates and voiding pressures in elderly men living in a community. *J Urol* 1994;151:1550–1553.
20. Madersbacher S, Pycha A, Schatzl G, et al. The aging lower urinary tract: a comparative urodynamic study of men and women. *Urology*. 1998;51:206–212.
21. Resnick NM, Yalla SV. Detrusor hyperactivity with impaired contractile function. An unrecognized but common cause of incontinence in elderly patients. *JAMA*. 1987
22. Zhao W, Aboushwareb T, Turner C, et al. Impaired Bladder Function in Aging Male Rats. *J Urol* 2010; 184(1): 378–385.
23. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 2005; 21(6): 775-7.
24. Cossio-Bolaños M, et al. Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats. *Nutr Hosp* 2013;28(6):2151-6.
25. Chung JM, Jung MJ, Lee SJ, Lee SD. Effects of Prolyl 4-Hydroxylase Inhibitor on Bladder Function, Bladder Hypertrophy and Collagen Subtypes in a Rat Model With Partial Bladder Outlet Obstruction. *Urology* 2012;80(6):1390.e7-1390.e12.
26. Weber K, Sun Y, Guarda E, Katwa L, Ratajska A, Cleutjens J, Zhou G. Myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: an overview of potential regulatory mechanisms. *Eur Heart J* 1995;162:4
27. Rockwell, W., Cohen, I. and Ehrlich, H.: Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review. *Plast. Reconst. Surg* 1989; 84: 827.
28. Landau EH, Jayanthi VR, Churchill BM, Shapiro E, et al. Loss of elasticity in dysfunctional bladders: urodynamic and histochemical correlation. *J Urol* 1994;152:702.
29. Shapiro E, Becich MJ, Perlman E, Lepor H. Bladder wall abnormalities in myelodysplastic bladders: a computer assisted morphometric analysis. *J Urol* 1991;145:1024.
30. Tekgul S, Yoshiino K, Bagli D, et al. Loss of elasticity in dysfunctional bladders: urodynamic and histochemical correlation. *J Urol* 1994;152(2 Pt 2):688-691.

4 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

1. Ocorreram alterações significativas na densidade volumétrica dos colágenos tipo I e, notadamente, no colágeno tipo III, na bexiga urinária de ratos no processo natural de envelhecimento
2. Observou-se declínio da densidade volumétrica do colágeno tipo III quando comparados ratos mais jovens com os animais mais velhos, e o momento em que estas alterações são mais significativas foram a partir dos 12 meses de vida do animal.

REFERÊNCIAS

1. Hayflick L. How and why we age. *Exp Gerontol* 1998;33(7-8):639-53
2. Kohn RR. Aging and age-related diseases: Normal processes. *Aging* 1985;28:1–44.
3. Harman D. Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;928:1-21.
4. Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1100:1-13.
5. Davidovic M, Sevo G, Svorcan P, Milosevic DP, Despotovic N, Erceg P. Old age as a privilege of the “selfish ones”. *Aging Dis*. 2010;1(2):139-46.
6. Jin K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging Dis* 2010; 1(2):72-74.
7. van Heemst D. Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging and Disease*. 2010;1:147–157.
8. Cornelius E. Increased incidence of lymphomas in thymectomized mice--evidence for an immunological theory of aging. *Experientia* 1972;28:459.
9. Rozemuller AJ, van Gool WA, Eikelenboom P. The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005;4:223–233.
10. Brys K, Vanfleteren JR, Braeckman BP. Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*. 2007;42:845–851.
11. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11:298–300.
12. McCay CM. Iodized Salt a Hundred Years Ago. *Science*. 1935;82:350–351.
13. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab*. 2007;6:280–293.
14. Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell* 2005; 120(4):437-47.
15. Garinis GA, van der Horst GT, Vijg J, Hoeijmakers JH. et al. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol* 2008; 10 (11) 1241-7.
16. Olovnikov AM. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol* 1996;31(4):443-8.

17. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med.* 2006;12(10):1133-8.
18. Bjorksten J. The crosslinkage theory of aging. *J Am Geriatr Soc* 1968;16(4):408-27.
19. Bjorksten J, Tenhu H. The crosslinking theory of aging--added evidence. *Exp Gerontol* 1990;25(2):91-5.
20. United Nations. Report of the Second World Assembly on Aging. Madrid, Spain: United Nations, April 8-12, 2002.
21. Lima-Costa MF, Veras R. Envelhecimento e saúde pública. *Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro* 2003; 19(3): 700-1.
22. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trends in aging--United States and worldwide. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; 52(6):101-4, 106.
23. Diokno AC, Brock BM, Brown MB, Herzog R. Prevalence of urinary incontinence and other urological symptoms in the non-institutionalized elderly. *J Urol.* 1986; 136:1022-1025.
24. Diokno AC, Brown MB, Goldstein NG, Herzog AR. Urinary flow rates and voiding pressures in elderly men living in a community. *J Urol* 1994;151:1550-1553.
25. Madersbacher S, Klingler HC, Schatzl G, et al. Age related urodynamic changes in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1996; 156:1662-1667.
26. Madersbacher S, Pycha A, Schatzl G, et al. The aging lower urinary tract: a comparative urodynamic study of men and women. *Urology* 1998;51:206-212.
27. Weinstein JR, Anderson S. The aging kidney: physiological changes. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010;17(4):302-7
28. Clavijo RI, Miner MM, Rajfer J. Erectile Dysfunction and Essential Hypertension: The Same Aging-related Disorder? *Rev Urol* 2014;16(4):167-71.
29. Chun AL, Wallace LJ, Gerald MC, et al. Effect of age on in vivo urinary bladder function in the rat. *J Urol.* 1988;139:625-627.
30. Hotta H, Morrison JF, Sato A, Uchida S. The effects of aging on the rat bladder and its innervation. *Jpn J Physiol.* 1995;45:823-836.
31. de Barros CA, Lorenzetti F, Ortiz V, Dambros M. Testosterone supplementation's effects on age-related bladder remodeling - experimental study in rats. *Aging Male* 2013;16(3):102-7.
32. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2004; 84(3):935-86

33. Deveaud CM, Macarak EJ, Kucich U, Ewalt DH, Abrams WR, Howard PS. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. *J Urol*. 1998; 160(4):1518-27.
34. Uvelius B, Mattiasson A. Detrusor collagen content in the denervated rat urinary bladder. *J Urol* 1986; 136 (5):1110-1112.
35. Macarak EJ, Howard PS: The role of collagen in bladder filling. *Adv Exp Med Biol* 1999; 462:215-223.
36. Stevenson K, Kucich U, Whitbeck C, Levin RM, Howard PS. Functional changes in bladder tissue from type III collagen-deficient mice. *Mol Cell Biochem* 2006;283(1-2):107-14.
37. Chang SL, Chung JS, Yeung MK, Howard PS, Macarak EJ. Roles of the lamina propria and the detrusor in tension transfer during bladder filling. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1999;201:38-45.
38. Paul GM, Tambara Filho R, Repka JC. Qualitative analysis of the deposit of collagen in bladder suture of rats treated with tacrolimus combined with mycophenolate-mofetil. *Int Braz J Urol* 2014;40(2):257-63.
39. Montes GS, Junqueira LC . The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86 Suppl 3:1-11.
40. Lacerda CAM. Fisiologia e Fisiopatologia: Estereologia do Rim: Determinação do V_v, N_v e volume médio do glomérulo. *J Bras Nefrol* 2000; 22(2):103-9.
41. Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10 (5):1100-23.
42. Lacerda CAM. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75(4):469-486.
43. van der Wijk J Jr, van der Wijk J Sr, Horn T, Nyengaard JR, Wijkstra H, Nordling J, Smedts F, de la Rosette J. Three-dimensional stereology as a tool for evaluating bladder outlet obstruction. *Scand J Urol Nephrol* 2008;42(1):40-6
44. Costa WS, de Carvalho AM, Babinski MA, Chagas MA, Sampaio FJ. Volumetric density of elastic and reticular fibers in transition zone of controls and patients with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2004 ;64(4):693-7.
45. Nielsen K, Orntoft T, Wolf H. Stereologic estimates of nuclear volume in noninvasive bladder tumors (Ta) correlated with the recurrence pattern. *Cancer* 1989;64(11):2269-74.
46. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections, *Histochem. J* 1979; 11(4) 447-455.

47. Dayan D, et al. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* 1989; 93 (1): 27-29.
48. Resnick NM, Yalla SV. Detrusor hyperactivity with impaired contractile function. An unrecognized but common cause of incontinence in elderly patients. *JAMA* 1987;257:3076-3081.
49. Ameda K, Sullivan MP, Bae RJ, Yalla SV. Urodynamic characterization of nonobstructive voiding dysfunction in symptomatic elderly men. *J Urol* 1999;162:142–146.
50. Siroky MB. The aging bladder. *Rev Urol* 2004; 6 Suppl 1:S3-7
51. Hashim H, Abrams P. Overactive bladder: an update. *Curr Opin Urol* 2007; 17:231.
52. Kaplan SA, Roehrborn CG, Chancellor M, Carlsson M, Bavendam T, Guan Z. Extended-release tolterodine with or without tamsulosin in men with lower urinary tract symptoms and overactive bladder: effects on urinary symptoms assessed by the International Prostate Symptom Score. *BJU Int* 2008;102(9):1133-9.
53. Wein AJ, Khullar V, Wang JT, et al. Achieving continence with antimuscarinic therapy for overactive bladder: effects of baseline incontinence severity and bladder diary duration. *BJU Int* 2007;99:360
54. Zhao W, Aboushwareb T, Turner C, et al. Impaired Bladder Function in Aging Male Rats. *J Urol*, 2010. 184(1): 378–385.
55. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*, 2013;4(6): 624-30.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos).

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – Faculdade de Ciências Médicas. **Normas, Procedimentos e Orientações para publicação de dissertações e teses da Faculdade de Ciências Médicas**. UNICAMP, 2008. Disponível em: <<http://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/Normas.pdf>>. Último acesso em: 01/02/2015.

PUBMED: a service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Último acesso em: 10/04/2015.

Canadian Council on Animal Care. **Guide for the Care and Use of Experimental Animals**. Disponível em:

<http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/>POLICIES/CATEG.H TM>. Acesso em 13/03/08.

APÊNDICES

Apêndice I – Resultados brutos

LAMINAS	CLASSE 1	CLASSE 2	CLASSE 3
b1a	2.88	1.64	95.48
b1b	3.93	2.03	94.04
b1c	10.02	15.19	74.79
b1d	42.57	9.87	47.56
b1e	13.98	7.61	78.41
b1f	19.77	9.63	70.60
b1g	20.34	4.01	83.67
b1h	15.79	3.53	80.68
b1i	6.55	2.98	90.47
b1j	2.85	1.76	95.39
b2a	4.22	3.41	92.37
b2b	5.72	3.74	90.54
b2c	5.68	1.07	93.25
b2d	6.98	3.47	89.55
b2e	16.92	3.18	79.90
b2f	0.73	4.27	95.00
b2g	0.56	5.83	93.61
b2h	6.71	2.93	90.36
b2i	5.93	2.62	91.45
b2j	4.74	4.23	91.03
b3a	6.09	1.72	92.19
b3b	3.75	0.39	95.86
b3c	3.99	0.72	95.29
b3d	7.33	2.07	90.60
b3e	5.69	0.81	93.50
b3f	4.73	2.02	93.25
b3g	3.04	5.81	91.15
b3h	4.82	3.99	91.19
b3i	6.39	2.79	90.82
b3j	7.33	3.10	89.57
b4a	2.99	1.10	95.91
b4b	0.99	1.11	97.90
b4c	5.92	2.18	91.90
b4d	4.98	3.29	91.73
b4e	3.17	2.97	93.86
b4f	4.38	2.71	92.91
b4g	24.14	5.32	70.54
b4h	22.77	4.88	72.35
b4i	17.39	2.93	79.68
b4j	15.91	3.21	80.88
b5a	21.40	4.90	73.70
b5b	19.11	3.82	77.07
b5c	11.23	3.28	85.49
b5d	14.47	2.92	82.61
b5e	14.92	9.30	75.78
b5f	7.46	2.17	90.37
b5g	6.97	3.76	89.27
b5h	15.82	3.11	81.07

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b5i	9.04	4.21	86.75
b5j	6.11	2.13	91.76
b6a	19.77	9.63	70.60
b6b	20.34	4.01	83.67
b6c	15.79	3.53	80.68
b6d	6.55	2.98	90.47
b6e	2.85	1.76	95.39
b6f	4.22	3.41	92.37
b6g	5.72	3.74	90.54
b6h	5.68	1.07	93.25
b6i	6.98	3.47	89.55
b6j	16.92	3.18	79.90
b7a	0.73	4.27	95.00
b7b	0.56	5.83	93.61
b7c	6.71	2.93	90.36
b7d	5.93	2.62	91.45
b7e	4.74	4.23	91.03
b7f	6.09	1.72	92.19
b7g	3.75	0.39	95.86
b7h	3.99	0.72	95.29
b7i	7.33	2.07	90.60
b7j	5.69	0.81	93.50
b8a	4.73	2.02	93.25
b8b	3.04	5.81	91.15
b8c	4.82	3.99	91.19
b8d	6.39	2.79	90.82
b8e	15.82	3.11	81.07
b8f	9.04	4.21	86.75
b8g	6.11	2.13	91.76
b8h	19.77	9.63	70.60
b8i	20.34	4.01	83.67
b8j	15.79	3.53	80.68
b9a	6.55	2.98	90.47
b9b	2.85	1.76	95.39
b9c	4.22	3.41	92.37
b9d	5.72	3.74	90.54
b9e	5.68	1.07	93.25
b9f	6.98	3.47	89.55
b9g	16.92	3.18	79.90
b9h	0.73	4.27	95.00
b9i	0.56	5.83	93.61
b9j	6.71	2.93	90.36
b10a	5.93	2.62	91.45
b10b	4.74	4.23	91.03
b10c	6.09	1.72	92.19
b10d	3.75	0.39	95.86
b10e	3.99	0.72	95.29
b10f	7.33	2.07	90.60
b10g	5.69	0.81	93.50
b10h	4.73	2.02	93.25
b10i	3.04	5.81	91.15
b10j	4.82	3.99	91.19
b11a	6.39	2.79	90.82

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b11b	4.22	3.41	92.37
b11c	5.72	3.74	90.54
b11d	5.68	1.07	93.25
b11e	6.98	3.47	89.55
b11f	16.92	3.18	79.90
b11g	0.73	4.27	95.00
b11h	0.56	5.83	93.61
b11i	6.71	2.93	90.36
b11j	5.93	2.62	91.45
b12a	4.74	4.23	91.03
b12b	6.09	1.72	92.19
b12c	3.75	0.39	95.86
b12d	3.99	0.72	95.29
b12e	7.33	2.07	90.60
b12f	5.69	0.81	93.50
b12g	4.73	2.02	93.25
b12h	3.04	5.81	91.15
b12i	4.82	3.99	91.19
b12j	22.77	4.88	72.35
b13a	17.39	2.93	79.68
b13b	15.91	3.21	80.88
b13c	21.40	4.90	73.70
b13d	19.11	3.82	77.07
b13e	11.23	3.28	85.49
b13f	14.47	2.92	82.61
b13g	14.92	9.30	75.78
b13h	7.46	2.17	90.37
b13i	6.97	3.76	89.27
b13j	15.82	3.11	81.07
b14a	5.93	2.62	91.45
b14b	4.74	4.23	91.03
b14c	6.09	1.72	92.19
b14d	3.75	0.39	95.86
b14e	3.99	0.72	95.29
b14f	7.33	2.07	90.60
b14g	5.69	0.81	93.50
b14h	4.73	2.02	93.25
b14i	3.04	5.81	91.15
b14j	4.82	3.99	91.19
b15a	0.73	4.27	95.00
b15b	0.56	5.83	93.61
b15c	6.71	2.93	90.36
b15d	5.93	2.62	91.45
b15e	4.74	4.23	91.03
b15f	6.09	1.72	92.19
b15g	3.75	0.39	95.86
b15h	3.99	0.72	95.29
b15i	7.33	2.07	90.60
b15j	5.69	0.81	93.50
b16a	4.73	2.02	93.25
b16b	3.04	5.81	91.15
b16c	4.82	3.99	91.19
b16d	6.39	2.79	90.82

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b16e	15.82	3.11	81.07
b16f	9.04	4.21	86.75
b16g	6.11	2.13	91.76
b16h	19.77	9.63	70.60
b16i	20.34	4.01	83.67
b16j	15.79	3.53	80.68
b17a	6.55	2.98	90.47
b17b	2.85	1.76	95.39
b17c	4.22	3.41	92.37
b17d	5.72	3.74	90.54
b17e	5.68	1.07	93.25
b17f	6.98	3.47	89.55
b17g	16.92	3.18	79.90
b17h	0.73	4.27	95.00
b17i	0.56	5.83	93.61
b17j	6.71	2.93	90.36
b18a	2.88	1.64	95.48
b18b	3.93	2.03	94.04
b18c	10.02	15.19	74.79
b18d	42.57	9.87	47.56
b18e	13.98	7.61	78.41
b18f	19.77	9.63	70.60
b18g	20.34	4.01	83.67
b18h	15.79	3.53	80.68
b18i	6.55	2.98	90.47
b18j	2.85	1.76	95.39
b19a	4.22	3.41	92.37
b19b	5.72	3.74	90.54
b19c	5.68	1.07	93.25
b19d	6.98	3.47	89.55
b19e	16.92	3.18	79.90
b19f	0.73	4.27	95.00
b19g	0.56	5.83	93.61
b19h	6.71	2.93	90.36
b19i	5.93	2.62	91.45
b19j	4.74	4.23	91.03
b20a	6.09	1.72	92.19
b20b	3.75	0.39	95.86
b20c	3.99	0.72	95.29
b20d	7.33	2.07	90.60
b20e	5.69	0.81	93.50
b20f	4.73	2.02	93.25
b20g	3.04	5.81	91.15
b20h	4.82	3.99	91.19
b20i	6.39	2.79	90.82
b20j	7.33	3.10	89.57
b21a	2.99	1.10	95.91
b21b	0.99	1.11	97.90
b21c	5.92	2.18	91.90
b21d	4.98	3.29	91.73
b21e	3.17	2.97	93.86
b21f	4.38	2.71	92.91
b21g	24.14	5.32	70.54

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b21h	22.77	4.88	72.35
b21i	17.39	2.93	79.68
b21j	15.91	3.21	80.88
b22a	4.73	2.02	93.25
b22b	3.04	5.81	91.15
b22c	4.82	3.99	91.19
b22d	6.39	2.79	90.82
b22e	15.82	3.11	81.07
b22f	9.04	4.21	86.75
b22g	6.11	2.13	91.76
b22h	19.77	9.63	70.60
b22i	20.34	4.01	83.67
b22j	15.79	3.53	80.68
b22a	6.55	2.98	90.47
b22b	2.85	1.76	95.39
b22c	4.22	3.41	92.37
b22d	5.72	3.74	90.54
b22e	5.68	1.07	93.25
b22f	6.98	3.47	89.55
b22g	16.92	3.18	79.90
b22h	0.73	4.27	95.00
b22i	0.56	5.83	93.61
b22j	6.71	2.93	90.36
b23a	2.88	1.64	95.48
b23b	3.93	2.03	94.04
b23c	10.02	15.19	74.79
b23d	42.57	9.87	47.56
b23e	13.98	7.61	78.41
b23f	19.77	9.63	70.60
b23g	20.34	4.01	83.67
b23h	15.79	3.53	80.68
b23i	6.55	2.98	90.47
b23j	2.85	1.76	95.39
b24a	4.22	3.41	92.37
b24b	5.72	3.74	90.54
b24c	5.68	1.07	93.25
b24d	6.98	3.47	89.55
b24e	16.92	3.18	79.90
b24f	0.73	4.27	95.00
b24g	0.56	5.83	93.61
b24h	6.71	2.93	90.36
b24i	5.93	2.62	91.45
b24j	4.74	4.23	91.03
b25a	21.08	7.53	71.39
b25b	19.75	4.02	76.23
b25c	11.31	1.98	86.71
b25d	10.04	6.24	83.72
b25e	22.74	4.99	72.27
b25f	11.18	4.05	84.77
b25g	31.18	4.04	64.78
b25h	21.33	4.74	73.93
b25i	18.07	6.01	75.92
b25j	20.42	5.22	74.36

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b26a	10.21	1.03	88.76
b26b	41.38	3.72	54.90
b26c	54.27	2.31	43.42
b26d	48.31	8.97	42.72
b26e	23.44	9.02	67.54
b26f	15.77	3.82	80.41
b26g	10.81	2.08	87.11
b26h	8.34	0.82	90.84
b26i	10.11	0.22	89.67
b26j	11.08	1.01	87.91
b27a	15.98	4.93	79.09
b27b	20.33	3.27	76.40
b27c	48.74	7.03	44.23
b27d	22.38	4.07	73.55
b27e	15.98	5.32	78.70
b27f	16.74	4.01	79.25
b27g	9.02	1.92	89.06
b27h	14.27	0.31	85.42
b27i	13.11	0.12	86.77
b27j	16.99	2.87	80.14
b28a	32.74	0.31	66.95
b28b	17.06	3.02	79.92
b28c	17.34	4.91	77.75
b28d	19.22	4.08	76.70
b28e	20.07	4.21	75.72
b28f	19.31	6.02	86.71
b28g	8.97	4.31	86.72
b28h	10.88	3.99	85.13
b28i	9.37	5.67	84.96
b28j	21.09	4.38	74.53
b29a	34.01	3.92	62.07
b29b	18.34	1.21	80.45
b29c	20.08	2.02	77.90
b29d	11.71	1.09	87.20
b29e	13.27	1.79	84.94
b29f	19.14	0.02	80.84
b29g	7.03	0.09	92.88
b29h	5.08	1.87	93.05
b29i	3.76	1.72	94.52
b29j	9.77	0.02	90.21
b30a	21.08	7.53	71.39
b30b	19.75	4.02	76.23
b30c	11.31	1.98	86.71
b30d	10.04	6.24	83.72
b30e	22.74	4.99	72.27
b30f	11.18	4.05	84.77
b30g	31.18	4.04	64.78
b30h	21.33	4.74	73.93
b30i	18.07	6.01	75.92
b30j	20.42	5.22	74.36
b31a	10.21	1.03	88.76
b31b	41.38	3.72	54.90
b31c	54.27	2.31	43.42

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I
CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III
CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b31d	48.31	8.97	42.72
b31e	23.44	9.02	67.54
b31f	15.77	3.82	80.41
b31g	10.81	2.08	87.11
b31h	8.34	0.82	90.84
b31i	10.11	0.22	89.67
b31j	11.08	1.01	87.91
b32a	15.98	4.93	79.09
b32b	20.33	3.27	76.40
b32c	48.74	7.03	44.23
b32d	22.38	4.07	73.55
b32e	15.98	5.32	78.70
b32f	16.74	4.01	79.25
b32g	9.02	1.92	89.06
b32h	14.27	0.31	85.42
b32i	13.11	0.12	86.77
b32j	16.99	2.87	80.14
b33a	32.74	0.31	66.95
b33b	17.06	3.02	79.92
b33c	17.34	4.91	77.75
b33d	19.22	4.08	76.70
b33e	20.07	4.21	75.72
b33f	19.31	6.02	86.71
b33g	8.97	4.31	86.72
b33h	10.88	3.99	85.13
b33i	9.37	5.67	84.96
b33j	21.09	4.38	74.53
b34a	34.01	3.92	62.07
b35b	18.34	1.21	80.45
b35c	20.08	2.02	77.90
b35d	11.71	1.09	87.20
b35e	13.27	1.79	84.94
b35f	19.14	0.02	80.84
b35g	7.03	0.09	92.88
b35h	5.08	1.87	93.05
b35i	3.76	1.72	94.52
b35j	9.77	0.02	90.21
b36a	15.98	4.93	79.09
b36b	20.33	3.27	76.40
b36c	48.74	7.03	44.23
b36d	22.38	4.07	73.55
b36e	15.98	5.32	78.70
b36f	16.74	4.01	79.25
b36g	9.02	1.92	89.06
b36h	14.27	0.31	85.42
b36i	13.11	0.12	86.77
b36j	16.99	2.87	80.14
b37a	32.74	0.31	66.95
b37b	17.06	3.02	79.92
b37c	13.27	1.79	84.94
b37d	19.14	0.02	80.84
b37e	8.34	0.82	90.84
b37f	10.11	0.22	89.67

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b37g	11.08	1.01	87.91
b37h	15.98	4.93	79.09
b37i	20.33	3.27	76.40
b37j	48.74	7.03	44.23
b38a	22.38	4.07	73.55
b38b	15.98	5.32	78.70
b38c	16.74	4.01	79.25
b38d	9.02	1.92	89.06
b38e	14.27	0.31	85.42
b38f	13.11	0.12	86.77
b38g	16.99	2.87	80.14
b38h	32.74	0.31	66.95
b38i	17.06	3.02	79.92
b38j	17.34	4.91	77.75
b39a	19.22	4.08	76.70
b39b	20.07	4.21	75.72
b39c	19.31	6.02	86.71
b39d	8.97	4.31	86.72
b39e	10.88	3.99	85.13
b39f	9.37	5.67	84.96
b39g	21.09	4.38	74.53
b39h	34.01	3.92	62.07
b39i	18.34	1.21	80.45
b39j	20.08	2.02	77.90
b40a	11.71	1.09	87.20
b40b	13.27	1.79	84.94
b40c	19.14	0.02	80.84
b40d	7.03	0.09	92.88
b40e	5.08	1.87	93.05
b40f	3.76	1.72	94.52
b40g	9.77	0.02	90.21
b40h	11.08	1.01	87.91
b40i	15.98	4.93	79.09
b40j	20.33	3.27	76.40
b41a	48.74	7.03	44.23
b41b	22.38	4.07	73.55
b41c	15.98	5.32	78.70
b41d	16.74	4.01	79.25
b41e	9.02	1.92	89.06
b41f	14.27	0.31	85.42
b41g	13.11	0.12	86.77
b41h	16.99	2.87	80.14
b41i	32.74	0.31	66.95
b41j	17.06	3.02	79.92
b42a	17.34	4.91	77.75
b42b	19.22	4.08	76.70
b42c	20.07	4.21	75.72
b42d	19.31	6.02	86.71
b42e	8.97	4.31	86.72
b42f	10.88	3.99	85.13
b42g	9.37	5.67	84.96
b42h	21.09	4.38	74.53
b42i	34.01	3.92	62.07

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b42j	18.34	1.21	80.45
b43a	20.08	2.02	77.90
b43b	11.71	1.09	87.20
b43c	13.27	1.79	84.94
b43d	19.14	0.02	80.84
b43e	9.77	0.02	90.21
b43f	15.98	4.93	79.09
b43g	20.33	3.27	76.40
b43h	48.74	7.03	44.23
b43i	22.38	4.07	73.55
b43j	15.98	5.32	78.70
b44a	16.74	4.01	79.25
b44b	9.02	1.92	89.06
b44c	14.27	0.31	85.42
b44d	13.11	0.12	86.77
b44e	11.71	1.09	87.20
b44f	13.27	1.79	84.94
b44g	19.14	0.02	80.84
b44h	7.03	0.09	92.88
b44i	5.08	1.87	93.05
b44j	3.76	1.72	94.52
b45a	13.11	2.07	84.82
b45b	10.73	3.02	86.25
b45c	14.72	2.01	83.27
b45d	10.27	2.31	87.42
b45e	12.34	2.04	85.62
b45f	12.27	1.09	86.64
b45g	11.99	0.92	87.09
b45h	10.24	1.07	88.69
b45i	9.77	0.04	90.19
b45j	8.84	0.03	91.13
b46a	8.09	0.01	83.81
b46b	10.72	0.71	88.57
b46c	10.09	0.02	89.89
b46d	6.78	0.11	93.11
b46e	3.41	0.01	96.58
b46f	5.86	1.02	93.12
b46g	10.17	0.00	89.83
b46h	10.98	0.00	89.02
b46i	5.72	0.03	94.25
b46j	4.98	1.72	93.30
b47a	10.17	0.00	89.83
b47b	15.68	1.09	83.23
b47c	14.22	0.00	85.78
b47d	16.13	1.31	82.56
b47e	10.77	0.01	89.22
b47f	13.11	2.07	84.82
b47g	10.73	3.02	86.25
b47h	14.72	2.01	83.27
b47i	10.27	2.31	87.42
b47j	12.34	2.04	85.62
b48a	12.27	1.09	86.64
b48b	11.99	0.92	87.09

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b48c	10.24	1.07	88.69
b48d	9.77	0.04	90.19
b48e	8.84	0.03	91.13
b48f	8.09	0.01	83.81
b48g	10.72	0.71	88.57
b48h	10.09	0.02	89.89
b48i	6.78	0.11	93.11
b48j	3.41	0.01	96.58
b49a	5.86	1.02	93.12
b49b	10.17	0.00	89.83
b49c	10.98	0.00	89.02
b49d	5.72	0.03	94.25
b49e	4.98	1.72	93.30
b49f	10.17	0.00	89.83
b49g	15.68	1.09	83.23
b49h	14.22	0.00	85.78
b49i	16.13	1.31	82.56
b49j	10.77	0.01	89.22
b50a	11.99	0.92	87.09
b50b	10.24	1.07	88.69
b50c	9.77	0.04	90.19
b50d	8.84	0.03	91.13
b50e	8.09	0.01	83.81
b50f	10.72	0.71	88.57
b50g	10.09	0.02	89.89
b50h	6.78	0.11	93.11
b50i	3.41	0.01	96.58
b50j	5.86	1.02	93.12
b51a	10.17	0.00	89.83
b51b	10.98	0.00	89.02
b51c	5.72	0.03	94.25
b51d	4.98	1.72	93.30
b51e	10.17	0.00	89.83
b51f	15.68	1.09	83.23
b51g	14.22	0.00	85.78
b51h	16.13	1.31	82.56
b51i	10.77	0.01	89.22
b51j	13.11	2.07	84.82
b52a	10.73	3.02	86.25
b52b	14.72	2.01	83.27
b52c	10.27	2.31	87.42
b52d	12.34	2.04	85.62
b52e	12.27	1.09	86.64
b52f	11.99	0.92	87.09
b52g	10.24	1.07	88.69
b52h	9.77	0.04	90.19
b52i	8.84	0.03	91.13
b52j	8.09	0.01	83.81
b53a	10.72	0.71	88.57
b53b	10.09	0.02	89.89
b53c	6.78	0.11	93.11
b53d	3.41	0.01	96.58
b53e	5.86	1.02	93.12

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b53f	10.17	0.00	89.83
b53g	10.98	0.00	89.02
b53h	5.72	0.03	94.25
b53i	4.98	1.72	93.30
b53j	10.17	0.00	89.83
b54a	15.68	1.09	83.23
b54b	14.22	0.00	85.78
b54c	16.13	1.31	82.56
b54d	10.77	0.01	89.22
b54e	10.09	0.02	89.89
b54f	6.78	0.11	93.11
b54g	3.41	0.01	96.58
b54h	5.86	1.02	93.12
b54i	10.17	0.00	89.83
b54j	10.98	0.00	89.02
b55a	5.72	0.03	94.25
b55b	4.98	1.72	93.30
b55c	10.17	0.00	89.83
b55d	15.68	1.09	83.23
b55e	14.22	0.00	85.78
b55f	16.13	1.31	82.56
b55g	10.77	0.01	89.22
b55h	11.99	0.92	87.09
b55i	10.24	1.07	88.69
b55j	9.77	0.04	90.19
b56a	8.84	0.03	91.13
b56b	8.09	0.01	83.81
b56c	10.72	0.71	88.57
b56d	10.09	0.02	89.89
b56e	6.78	0.11	93.11
b56f	14.22	0.00	85.78
b56g	16.13	1.31	82.56
b56h	10.77	0.01	89.22
b56i	13.11	2.07	84.82
b56j	10.73	3.02	86.25
b57a	14.72	2.01	83.27
b57b	10.27	2.31	87.42
b57c	12.34	2.04	85.62
b57d	12.27	1.09	86.64
b57e	11.99	0.92	87.09
b57f	10.24	1.07	88.69
b57g	9.77	0.04	90.19
b57h	8.84	0.03	91.13
b57i	8.09	0.01	83.81
b57j	10.72	0.71	88.57
b58a	10.09	0.02	89.89
b58b	6.78	0.11	93.11
b58c	14.22	0.00	85.78
b58d	16.13	1.31	82.56
b58e	10.77	0.01	89.22
b58f	13.11	2.07	84.82
b58g	10.73	3.02	86.25
b58h	14.72	2.01	83.27

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b58i	10.27	2.31	87.42
b58j	12.27	1.09	86.64
b59a	11.99	0.92	87.09
b59b	10.24	1.07	88.69
b59c	9.77	0.04	90.19
b59d	8.84	0.03	91.13
b59e	8.09	0.01	83.81
b59f	10.72	0.71	88.57
b59g	10.09	0.02	89.89
b59h	12.34	2.04	85.62
b59i	12.27	1.09	86.64
b59j	11.99	0.92	87.09
b60a	11.99	0.92	87.09
b60b	10.24	1.07	88.69
b60c	9.77	0.04	90.19
b60d	8.84	0.03	91.13
b60e	8.09	0.01	83.81
b60f	10.72	0.71	88.57
b60g	10.09	0.02	89.89
b60h	6.78	0.11	93.11
b60i	3.41	0.01	96.58
b60j	5.86	1.02	93.12
b61a	7.14	3.07	89.79
b61b	6.98	0.00	93.02
b61c	7.06	0.01	92.93
b61d	3.49	0.01	96.50
b61e	2.08	0.01	97.91
b61f	9.72	0.00	90.28
b61g	4.73	0.00	95.27
b61h	2.99	0.00	97.01
b61i	9.02	0.00	90.98
b61j	4.01	0.00	95.99
b62a	3.99	0.00	96.01
b62b	2.03	0.01	95.93
b62c	4.79	0.02	95.19
b62d	5.89	0.02	94.09
b62e	9.02	0.01	90.97
b62f	5.04	0.01	94.95
b62g	15.02	0.01	84.97
b62h	11.97	0.02	88.01
b62i	10.09	0.00	89.91
b62j	10.38	0.00	89.62
b63a	11.27	0.00	88.73
b63b	2.98	0.01	97.01
b63c	2.71	0.02	94.56
b63d	4.54	0.02	95.44
b63e	2.87	0.00	97.13
b63f	8.92	0.01	91.07
b63g	8.77	0.01	82.45
b63h	14.88	0.01	85.11
b63i	16.32	0.81	82.87
b63j	9.14	0.01	90.85
b64a	10.77	0.01	89.22

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b64b	9.78	0.00	90.22
b64c	12.69	0.01	87.30
b64d	8.74	0.01	91.25
b64e	10.92	0.01	89.07
b64f	11.33	0.01	88.66
b64g	10.98	0.00	89.02
b64h	6.51	0.01	93.48
b64i	12.11	0.01	87.88
b64j	9.72	0.01	90.27
b65a	8.13	0.00	91.87
b65b	14.21	0.00	85.79
b65c	13.14	0.00	86.86
b65d	15.78	0.00	84.22
b65e	17.11	0.00	82.89
b65f	12.33	0.00	87.67
b65g	8.17	0.00	91.83
b65h	7.25	0.00	92.75
b65i	9.47	0.00	90.53
b65j	6.52	0.00	93.48
b66a	10.63	0.00	89.37
b66b	11.41	1.97	86.62
b66c	15.17	0.86	83.97
b66d	14.23	1.23	84.54
b66e	12.68	0.74	86.58
b66f	15.14	0.53	84.33
b66g	7.14	3.07	89.79
b66h	6.98	0.00	93.02
b66i	7.06	0.01	92.93
b66j	3.49	0.01	96.50
b67a	2.08	0.01	97.91
b67b	9.72	0.00	90.28
b67c	4.73	0.00	95.27
b67d	2.99	0.00	97.01
b67e	9.02	0.00	90.98
b67f	4.01	0.00	95.99
b67g	3.99	0.00	96.01
b67h	2.03	0.01	95.93
b67i	4.79	0.02	95.19
b67j	5.89	0.02	94.09
b68a	9.02	0.01	90.97
b68b	5.04	0.01	94.95
b68c	15.02	0.01	84.97
b68d	11.97	0.02	88.01
b68e	10.09	0.00	89.91
b68f	10.38	0.00	89.62
b68g	11.27	0.00	88.73
b68h	2.98	0.01	97.01
b68i	2.71	0.02	94.56
b68j	4.54	0.02	95.44
b69a	2.87	0.00	97.13
b69b	8.92	0.01	91.07
b69c	8.77	0.01	82.45
b69d	14.88	0.01	85.11

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I

CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III

CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

b69e	16.32	0.81	82.87
b69f	9.14	0.01	90.85
b69g	10.77	0.01	89.22
b69h	9.78	0.00	90.22
b69i	12.69	0.01	87.30
b69j	8.74	0.01	91.25
b70a	10.92	0.01	89.07
b70b	11.33	0.01	88.66
b70c	10.98	0.00	89.02
b70d	6.51	0.01	93.48
b70e	16.14	0.00	83.86
b70f	6.98	0.00	93.02
b70g	9.37	0.01	90.62
b70h	10.64	0.00	89.36
b70i	9.11	0.01	90.88
b70j	7.52	0.01	92.47
b71a	10.67	0.00	89.33
b71b	10.98	0.03	88.99
b71c	16.75	1.17	82.08
b71d	10.36	0.00	89.64
b71e	9.17	0.00	90.83
b71f	12.62	0.00	87.38
b71g	9.57	0.00	90.43
b71h	10.19	0.01	89.80
b71i	8.51	0.00	91.49
b71j	10.13	0.00	89.87
b72a	5.91	0.00	94.09
b72b	3.77	0.00	96.23
b72c	5.92	0.00	94.08
b72d	8.56	0.00	91.44
b72e	10.43	0.00	89.57
b72f	7.05	0.00	92.95
b72g	9.32	0.01	90.66
b72h	8.11	0.00	91.89
b72i	11.57	0.01	88.42
b72j	12.69	0.01	87.30

Legenda

CLASSE I - VERMELHO/COLÁGENO I
CLASSE 2 = VERDE/ COLÁGENO III
CLASSE 3 = PRETO/OUTROS

GRUPOS

37-48	3 meses
1 a 12	6 meses
13-24	9 meses
25-36	12 meses
49-60	18 meses
61-72	24 meses

Apêndice II – Peso dos Animais – Comparação entre os grupos

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Peso do Animal (g)	3 meses	12	379,1	379,5	328	438	29,6	
	6 meses	12	457,4	449,0	404	555	45,0	
	9 meses	12	514,0	520,0	464	589	40,9	
	12 meses	12	555,5	563,0	485	610	36,5	
	18 meses	12	542,7	550,5	412	673	81,3	
	24 meses	12	523,8	529,5	456	616	59,8	<0,001

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

Grupos comparados (peso dos animais)	Valor de p
3 x 6	<0,001
3 x 9	<0,001
3 x 12	<0,001
3 x 18	<0,001
3 x 24	<0,001
6 x 9	0,009
6 x 12	<0,001
6 x 18	<0,001
6 x 24	0,003
9 x 12	0,054
9 x 18	0,180
9 x 24	0,646
12 x 18	0,546
12 x 24	0,138
18 x 24	0,374

Apêndice II – Estatura dos Animais – Comparação entre os grupos

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Estatura do Animal (cm)	3 meses	12	22,4	22,3	21	24	1,15	
	6 meses	12	24,2	23,9	23	26,5	1,08	
	9 meses	12	26,7	26,9	25	28	0,89	
	12 meses	12	27,0	26,8	24	30	1,57	
	18 meses	12	27,3	27,0	26	29	1,14	
	24 meses	12	25,5	26,0	24	28	1,17	<0,001

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

Grupos comparados (estatura dos animais)	Valor de p
3 x 6	<0,001
3 x 9	<0,001
3 x 12	<0,001
3 x 18	<0,001
3 x 24	<0,001
6 x 9	<0,001
6 x 12	<0,001
6 x 18	<0,001
6 x 24	0,009
9 x 12	0,583
9 x 18	0,288
9 x 24	0,013
12 x 18	0,606
12 x 24	0,003
18 x 24	0,001

ANEXOS

Anexo I – Certificado de Aprovação pelo Comitê de Ética



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 463

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.032620/2010-10

APROVADO: 17/08/2010 – R.O. 07/2010

TÍTULO: Avaliação anátomo-fisiológica do envelhecimento urogenital masculino

AUTORES: Rogério de Fraga, Édison Luiz P. Farias, Djanira Veronez, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Marta Margarete Cestari, Helena Cristina Silva de Assis, Francisco Filipak Neto, Alanna Silva Huk, Larissa Remonti Bessani

DEPARTAMENTO: Anatomia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA

Anexo II – Normas para submissão de artigos no *Journal of Urology*

Information for Authors

The Journal of Urology® contains 4 sections: Adult Urology, Pediatric Urology, Investigative Urology and Urological Survey. Rapid Communications are welcomed. The Adult and Pediatric Urology Sections (original articles) usually do not publish laboratory animal studies. The Investigative Urology Section (research articles) does not publish clinically oriented articles, and does not require prior approval for Review Articles. Unsolicited material is not accepted for Urological Survey.

All communications concerning editorial matters should be sent to:

The Journal of Urology®
Publications Department
American Urological Association
1000 Corporate Boulevard
Linthicum, MD 21090
Telephone (410) 689-3922, FAX (410) 689-3906
e-mail: publications@auanet.org

MANUSCRIPT SUBMISSION. Authors must submit their manuscripts through the Web-based tracking system at <https://www.editorialmanager.com/ju>. The site contains instructions and advice on how to use the system, guidance on the creation/scanning and saving of electronic art, and supporting documentation. In addition to allowing authors to submit manuscripts on the Web, the site allows authors to follow the progression of their manuscript through the peer review process. Authors are asked NOT to mail hard copies of the manuscript to the editorial office. They may, however, mail to the editorial office any material that cannot be submitted electronically.

For potentially acceptable manuscripts, the period between receipt of all reviews and when an editorial decision is made is usually longer.

AUTHOR'S RESPONSIBILITY. Manuscripts must be accompanied by a cover letter, an AUA Disclosure Form and an Author Submission Requirement Form (see last page) signed by all authors. The letter should include the complete address, telephone number, FAX number and e-mail address of the designated corresponding author as well as the names of potential reviewers. The corresponding author is responsible for indicating the source of extramural funding, in particular that provided by commercial sources, internal review board approval of study, accuracy of the references and all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

Manuscripts submitted without all signatures on all statements will be returned to the authors immediately. Electronic signatures are acceptable.

Authors are expected to submit complete and correct manuscripts. Due to the large number of high quality articles being submitted and to avoid significant delay in publication, the Editors find it necessary to insist that the length of manuscripts, and number of references and illustrations conform to the requirements indicated herein. No paper will be reviewed until these requirements are met. Published manuscripts become the sole property of *The Journal of Urology®* and copyright will be taken out in the name of the American Urological Association Education and Research, Inc.

All accepted NIH funded articles must be directly deposited to PubMed Central by the authors of the article for public access 12 months after the publication date.

PAGE PROOFS AND CORRECTIONS. The corresponding author will receive electronic page proofs to check the typeset article before publication. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (eg, reprint order form) will be sent to the corresponding author by e-mail. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading and printing the files and for faxing the corrected page proofs to the editorial office.

It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Changes that have been made to conform to journal style will stand if they do not alter the author's meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content will be made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material will be disallowed. The editorial office reserves the right to disallow extensive alterations. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and corrections fixed within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the cover letter accompanying the page proofs.

Rapid Review Manuscripts that contain important and timely information will be reviewed by 2 consultants and the editors within 72 hours of receipt, and authors will be notified of the disposition immediately thereafter. The authors must indicate in their submittal letter why they believe their manuscript warrants rapid review. A \$250 processing fee should be forwarded with the manuscript at the time of submission. Checks should be made payable to the American Urological Association. If the editors decide that the paper does not warrant rapid review, the fee will be returned

to the authors, and they may elect to have the manuscript continue through the standard review process. Payment for rapid review guarantees only an expedited review and not acceptance.

Original and Research Articles should be arranged as follows: Title Page, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Tables, Legends. The title page should contain a concise, descriptive title, the names and affiliations of all authors, and a brief descriptive runninghead not to exceed 50 characters. One to five key words should be typed at the bottom of the title page. These words should be identical to the medical subject headings (MeSH) that appear in the Index Medicus of the National Library of Medicine. The abstract should not exceed 250 words (abbreviations are not to be substituted for whole words) and must conform to the following style: Purpose, Materials and Methods, Results and Conclusions.

References should not exceed 30 readily available citations for all articles (except Review Articles). Self-citations should be kept to a minimum. References should be cited by superscript numbers as they appear in the text, and they should not be alphabetized. References should include the names and initials of the first 3 authors, the complete title, the abbreviated journal name according to the Index Medicus of the National Library of Medicine, the volume, the beginning page number and the year. References to book chapters should include names and initials of the first 3 chapter authors, chapter title, book title and edition, names and initials of the first 3 book editors, city of publisher, publisher, volume number, chapter number, page range and year. In addition to the above, references to electronic publications should include type of medium, availability statement and date of accession. The statistical methods should be indicated and referenced. Enough information should be presented to allow an independent critical assessment of the data.

Digital illustrations and tables should be kept to a necessary minimum and their information should not be duplicated in the text. No more than 10 illustrations should accompany the manuscript for clinical articles. Magnifications for photomicrographs should be supplied and graphs should be labeled clearly. Reference to illustrations, numbered with Arabic numerals, must be provided in the text. Blurry or unrecognizable illustrations are not acceptable. Visit <http://www.elsevier.com/author-schemas/artwork-and-media-instructions> for detailed instructions for digital art. The use of color is encouraged at no charge to the authors.

Tables should be numbered and referred to in the text. In general, they should present summarized rather than individual raw data. Due to page constraints caused by the large number of high quality manuscripts being submitted to *The Journal of Urology*, the editors find it necessary to offer publishing alternatives. Therefore, authors may be requested to post tables and illustrations as supplementary material on The Journal website at no charge or print tables and illustrations in the article at a per page rate of \$295.

Letters to the Editor should be useful to urological practitioners. The length should not exceed 500 words. Only Letters concerning articles published in the Journal within the last year are considered.

Review Articles (comprehensive only) should not be submitted without prior approval. Queries for these articles should be accompanied by a detailed outline of the proposed article, an abstract not to exceed 750 words and an estimate of the length of the manuscript to be submitted. The format is the same as that of an Original Article.

Systematic reviews do not require prior approval for submission, and are limited to 2500 words and 30 references.

Special Articles are scientific reports of original clinical research and state-of-the-art topics, and are designated as such by the Editors. The format is the same as that of an Original Article.

New Technology and Techniques feature high quality manuscripts that describe the innovative clinical application of new technology or techniques in all disciplines of urology, and are designated as such by the Editors. Addressing diagnosis or management of urological conditions, this feature covers the categories of 1) cutting-edge technology, 2) novel/modified techniques and 3) outcomes data derived from use of 1 and/or 2. The format is the same as that of an Original Article, although fewer words are preferred to allow more space for illustrations.

Opposing Views are submitted by invitation only.

Video Clips may be submitted for posting on The Journal web site. They are subject to peer review. Video files must be compressed to the smallest possible size that still allows for high resolution and quality presentation. The size of each clip should not exceed 10MB. File size limitation is intended to ensure that end-users are able to download and view files in a reasonable time frame. If files exceed the specified size limitation, they will not be posted to the web site and returned to the author for resubmission. For complete instructions e-mail: publications@auanet.org.

Anexo III – Protocolo de Submissão do Artigo ao *Journal of Urology*

Submission Confirmation for STEREOLOGICAL STUDY OF
COLLAGEN IN THE AGING OF URINARY BLADDER IN RATS



Dear Dr. Zeni:

Your manuscript entitled STEREOLOGICAL STUDY OF COLLAGEN IN THE AGING OF URINARY BLADDER IN RATS has been received by *The Journal of Urology*.

You will be notified of the manuscript number once an Editor has been assigned. You will be able to check on the status of your paper by logging into Editorial Manager as an Author at <http://ju.edmgr.com/>.

The Editor will notify you of a decision within the next 4-6 weeks.

Thank you for submitting your manuscript to *The Journal of Urology*.

Sincerely yours,

Mrs. Deborah F. Polly
Executive Editor
Director of Publications
American Urological Association